

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DA ESTIMULAÇÃO DO CÓRTEX PRÉ-
LÍMBICO NO PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA AVERSIVA:
ÊNFASE NA GENERALIZAÇÃO DO MEDO E RESISTÊNCIA
AO PREJUÍZO DE RECONSOLIDAÇÃO POR CANABIDIOL**

ANA CAROLINA VANVOSEN

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Bertoglio

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vanvossen, Ana Carolina
INFLUÊNCIA DA ESTIMULAÇÃO DO CÓRTEX PRÉ-LÍMBICO NO
PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA AVERSIVA: ÊNFASE NA GENERALIZAÇÃO
DO MEDO E RESISTÊNCIA AO PREJUÍZO DE RECONSOLIDAÇÃO POR
CANABIDIOL / Ana Carolina Vanvossen ; orientador, Leandro
José Bertoglio - Florianópolis, SC, 2016.
123 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. córtex pré-límbico. 3. generalização.
4. consolidação da memória. 5. reconsolidação da memória. I.
Bertoglio, Leandro José. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.
Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais Nazaré e Rudy, pois se não fosse por eles, eu não estaria defendendo um doutorado hoje.

Ao professor Dr. Leandro José Bertoglio, por ter aberto as portas do seu laboratório e me orientado durante os anos de pós-graduação. Por todos os seus ensinamentos, dedicação e paciência.

Aos professores Dr. Jorge Quillfeldt, Dra. Danielle Aguiar, Dr. Antônio de Pádua Carobrez, Dr. Rui Prediger, Dr. Marcelo Giachero e Dra. Eloisa Pavesi, por aceitarem o convite para compor a banca e pela colaboração no aperfeiçoamento desse trabalho.

À todos os professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação. Aos funcionários do LAMEB, pelo suporte técnico. Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À Marina, pelo trabalho em conjunto no laboratório e pela amizade. À Fer Marin, pelo carinho e ajuda. Fizeram a diferença nos meus dias.

Aos demais colegas de laboratório, Rafael, Fer Troyner, pelo auxílio nos experimentos, discussões e amizade. Aos alunos de iniciação científica que ajudaram na execução dos experimentos. À Cris e ao Lucas, que me ensinaram tantas coisas e contribuíram para a minha formação.

Aos amigos da Paróquia da Trindade, que estão sempre comigo. Ao Marlon, que com sua dedicação e amor me ajudou a terminar meu doutorado. À Mel, pela amizade, cuidado e carinho. À Bia, pela amizade mesmo de longe. À todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

“Ad maiorem Dei gloriam.”
(Santo Inácio de Loyola)

RESUMO

O córtex pré-límbico (PL) é uma subregião do córtex pré-frontal medial (CPFm) crítica para a consolidação, reconsolidação e expressão de memórias aversivas. Em roedores, o aumento de sua atividade está envolvido com um aumento na expressão do medo; e em humanos, a região homóloga apresenta-se hiperativada em transtornos psiquiátricos que envolvem medo intenso. Uma característica desses transtornos é a generalização do medo, um prejuízo em restringir o medo ao contexto apropriado, e que pode ser desenvolvida após o armazenamento intenso de uma memória aversiva. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar se o aumento da atividade do córtex PL durante o processamento de uma memória de medo contextual em ratos seria capaz de induzir generalização do medo. Para isso, ratos foram submetidos à um protocolo de condicionamento de medo contextual e, imediatamente após, tiveram o córtex PL estimulado através da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (30-300 pmol/lado). O nível de congelamento durante a reexposição ao contexto pareado (Teste A) apresentou-se elevado em todos os grupos. Os animais que tiveram o córtex PL estimulado com 100 pmol de NMDA também apresentaram níveis significativamente mais elevados de congelamento no contexto não pareado (Teste B), sugerindo a ocorrência de generalização do medo. Adicionalmente, a estimulação do córtex PL durante a reconsolidação da memória de medo contextual também foi capaz de induzir a ocorrência de generalização. Além disso, a memória potencializada pelo aumento da atividade do córtex PL durante a consolidação mostrou-se menos propensa à extinção, bem como mais resistente ao prejuízo de reconsolidação induzido pelo canabidiol (10 mg/kg). A facilitação da labilização dessa memória com D-cicloserina (15 mg/kg) resgatou o efeito amnésico do canabidiol na reconsolidação e reduziu a generalização do medo. Esses resultados sugerem que a hiperatividade do córtex PL na formação e manutenção de memórias aversivas pode levar ao desenvolvimento de características exacerbadas de medo, como a generalização, o prejuízo de extinção e a resistência ao prejuízo de reconsolidação.

PALAVRAS-CHAVE: córtex pré-límbico, generalização do medo, consolidação da memória, reconsolidação da memória.

ABSTRACT

The prelimbic (PL) part of the medial prefrontal cortex (mPFC) is involved in aversive memory consolidation, reconsolidation and expression. In rodents, its increased activity is involved in an increased fear expression; and in humans, its homologous brain region is hyperactivated in psychiatric disorders involving high fear. The fear generalization is a feature of this disorders, that is a loss in restrict fear in the appropriate context and can be developed after the intense formation of an aversive memory. Thus, the objective of the present study was to investigate whether the increased activity of PL cortex during the contextual fear memory processing would be able to induce fear generalization. Rats were submitted to contextual fear conditioning and had the PL stimulated through NMDA receptors activation (30-300pmol/side) immediately after. The freezing behavior was increased in all groups on the paired context (Test A). NMDA-stimulated group also showed more freezing behavior on the non-paired context (Test B), suggesting the occurrence of fear generalization. The PL stimulation during memory reconsolidation was similarly able to induce fear generalization. In addition, the PL cortex hyperactivity during memory consolidation induce a less prone fear extinction memory and a resistance in impaired reconsolidation by cannabidiol (10 mg/kg). The facilitation of memory labilization with D-cicloserine (15 mg/kg) rescued the amnestic effect of cannabidiol on memory reconsolidation and also decreased fear generalization. These results suggests that the PL cortex hyperactivity in the formation and maintenance of aversive memories can lead to development of exacerbated characteristics of fear, such as generalization, impaired extinction and a resistance in impaired reconsolidation.

KEYWORDS: prelimbic cortex, fear generalization, memory consolidation, memory reconsolidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática das etapas de formação das memórias de longa duração.....	21
Figura 2.	Representação esquemática da reconsolidação como uma nova etapa de estabilização das memórias.....	30
Figura 3.	A labilização como peça chave na indução da reconsolidação.....	33
Figura 4.	Representação esquemática das sub-regiões do córtex pré-frontal medial de ratos em um corte coronal.....	35
Figura 5.	Conexões entre as regiões do córtex pré-frontal medial.....	36
Figura 6.	Desenho esquemático de um corte coronal do córtex pré-frontal medial de ratos ilustrando as principais sub-regiões do CPFm.....	48
Figura 7.	Familiarização ao contexto e associação do contexto (EC) com o estímulo aversivo (EI).....	49
Figura 8.	Evocação da memória previamente consolidada.....	51
Figura 9.	Indução de generalização com base no aprendizado.....	52
Figura 10.	Indução da reconsolidação ou extinção da memória de medo contextual.....	53
Figura 11.	Efeitos da estimulação do córtex pré-límbico durante a consolidação de uma memória de medo contextual forte na indução de generalização.....	58
Figura 12.	Efeito da microestimulação do córtex pré-límbico após o condicionamento na consolidação de uma memória de medo contextual fraca.....	59

Figura 13.	Expressão de Arc no PL em função do condicionamento de medo contextual e da estimulação do córtex PL.....	61
Figura 14.	Efeito da microestimulação do córtex pré-límbico a longo prazo.....	62
Figura 15.	Efeito da intensidade do condicionamento e da microestimulação do córtex pré-límbico a longo prazo.....	63
Figura 16.	Comportamento avaliado no labirinto em cruz elevado.....	64
Figura 17.	Efeito da inativação temporária do córtex pré-límbico na generalização do medo induzida pelo antagonista de receptores α_2 adrenérgicos ioimbina.....	66
Figura 18.	Efeito da microestimulação do córtex pré-límbico na reconsolidação da memória de medo contextual na indução de generalização do medo.....	67
Figura 19.	Susceptibilidade da memória potencializada à extinção.....	69
Figura 20.	Efeito do canabidiol na reconsolidação da memória potencializada.....	70
Figura 21.	Influência da facilitação da labilização com DCS no efeito do CBD na reconsolidação da memória potencializada.....	72
Figura 22.	Influência do aumento da sessão de evocação no efeito do CBD na reconsolidação da memória potencializada.....	73
Figura 23.	A importância do nível de aprendizado na indução da generalização.....	76
Figura 24.	Sugestão de um circuito neuronal de generalização do medo.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μl: microlitro

ANOVA: Análise de variância

Arc: Proteína associada ao citoesqueleto regulada por ativação, do inglês "*activity-regulated cytoskeletal protein*"

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês "brain-derived neurotrophic factor"

BLA: amígdala basolateral

BSA: soro albumina bovina, do inglês "*bovine serum protein*"

CA: córtex cingulado anterior

CB1: receptor canabinoide do tipo 1

CBD: canabidiol

CaMKII: proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina II, do inglês "*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*"

CeA: amígdala central

CPFm: córtex pré-frontal medial

DAB: 3'3'.diaminobenzidina

DCS: D-cicloserina

EC: estímulo condicionado

EI: estímulo incondicionado

EPM: erro padrão da média

GABA: ácido γ-aminobutírico

I.P.: intraperitoneal

IL: córtex infralímbico

IOI: ioimbina, antagonista de receptores α2-adrenérgicos

ITC: células intercaladas

Kg: quilograma

LC: *locus coeruleus*

LCE: labirinto em cruz elevado

LPT: potencialização de longa duração, do inglês "*long-term potentiation*"

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês "*mitogen-activated protein kinase*"

mg: miligrama

ml: mililitro

MUS: muscimol

NMDA: N-metil-D-aspartato

nmol: nanomol

PAG: matéria cinzenta periaqueductal

PBS: tampão fosfato-salina

PDK1: quinase dependente de fosfoinosítídeo 1, do inglês "*phosphoinositide dependent kinase 1*"

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase, do inglês "*phosphoinositide 3-kinase*"

PKA: proteína quinase A

PL: córtex pré-límbico

PKM ζ : proteína quinase M ζ , do inglês "*protein kinase M ζ* ".

pmol: picomol

PTSD: transtorno de estresse pós traumático, do inglês "*posttraumatic stress disorder*"

VEI: veículo

Zif268: do inglês "*zinc finger transcription factor*"

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Como as memórias são formadas – a teoria clássica da consolidação	19
1.2 Memória emocional	22
1.3 A generalização do medo.....	23
1.4 O estudo das memórias aversivas – condicionamento clássico pavloviano	24
1.5 A extinção da memória de medo	28
1.6 Modificando o que foi armazenado – a reconsolidação.....	29
1.7 A labilização das memórias	32
1.8 O córtex pré-frontal medial.....	34
1.9 Receptores NMDA e o córtex pré-frontal medial.....	38
2. HIPÓTESE.....	41
3. OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos Específicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Considerações éticas	45
4.2 Animais.....	45
4.3 Drogas.....	45
4.4 Cirurgia estereotáxica	46
4.5 Condicionamento de medo contextual.....	48
4.6 Labirinto em cruz elevado	54
4.7 Imunohistoquímica	55
4.8 Análise estatística	56
5. RESULTADOS.....	57

5.1 Caracterização do efeito da microestimulação do córtex pré-límbico na generalização do medo	57
5.2 Confirmação do efeito da microestimulação do córtex pré-límbico na facilitação da consolidação da memória de medo contextual	58
5.3 Avaliação da expressão de Arc no PL após sua microestimulação durante a consolidação da memória de medo	59
5.4 Avaliação da duração da generalização do medo com base no protocolo de condicionamento e intensidade da microestimulação do córtex PL	60
5.5 Investigação da influência da microestimulação do córtex pré-límbico durante a consolidação da memória de medo contextual no comportamento de esquivas avaliado no labirinto em cruz elevado ..	63
5.6 Avaliação do papel do córtex pré-límbico na generalização do medo induzida pelo antagonista de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos ioimbina.....	65
5.7 Investigar o efeito da microestimulação do córtex pré-límbico durante a reconsolidação da memória de medo contextual	66
5.8 Investigação da susceptibilidade da memória potencializada à extinção	67
5.9 Efeito do canabidiol na reconsolidação da memória potencializada.....	69
5.10 Influência do pré-tratamento com DSC no efeito do CBD na reconsolidação da memória potencializada	71
5.11 Influência do aumento da sessão de evocação no efeito do CBD na reconsolidação da memória potencializada	72
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÕES.....	93
8. PERSPECTIVAS E POSSÍVEIS LIMITAÇÕES DESTE ESTUDO.....	95
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
10. REFERÊNCIAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

Tudo o que sabemos a respeito do mundo e da nossa própria vida é composto com base nas informações que adquirimos e aprendemos ao longo do tempo. Informações necessárias para o nosso dia-a-dia, para a execução de tarefas, ou até mesmo para a nossa sobrevivência, são armazenadas em nosso cérebro na forma de memórias. Alguns filósofos vão além, dizendo que a memória é a "marca" do ser humano (BERNECKER, 2010). O termo “memória” pode ser descrito como retenção de informações ao longo do tempo. Ou ainda, a capacidade de utilizar experiências passadas no presente ou no futuro. Podemos dizer que nós somos, essencialmente, aquilo que lembramos.

1.1 Como as memórias são formadas – a teoria clássica da consolidação

O aprendizado consiste no processo em que o sujeito é confrontado com um evento qualquer, permitindo que uma informação relacionada seja adquirida. Esse processo é chamado de aquisição da memória (DUDAI, 2002). Essa informação necessita ser estabilizada no cérebro para, então, poder ser acessada (e consequentemente evocada – ou lembrada). Essa estabilização progressiva pós-aquisição é chamada de consolidação da memória (do latim “*consolidare*”, tornar concreto), processo que faz com que a memória seja armazenada de maneira duradoura. Esse termo foi cunhado em 1900 pelos psicólogos alemães Georg Miller e Alfons Pilzecker, quando eles demonstraram pela primeira vez que a memória precisa de um determinado tempo para “se fixar” no cérebro (MÜLLER; PILZECKER, 1900). O primeiro estudo publicado que avaliou o efeito de uma droga no aprendizado foi realizado por Lashley (1917), no qual ele demonstrou que baixas doses de estricnina administrada em ratos antes de um condicionamento em um labirinto melhorava o desempenho comportamental. Com base no trabalho pioneiro de Muller e Pilzecker (1900), estudos subsequentes sugeriram que uma abordagem mais adequada para o estudo das memórias seria investigar o efeito de manipulações administradas imediatamente após a aquisição do aprendizado, utilizando eletrochoques (DUNCAN, 1949; McGAUGH, 1996) ou drogas (McGAUGH, 1973; McGAUGH; PETRINOVICH, 1965).

Em paralelo à essas descobertas, o neurocientista canadense Donald Hebb propôs uma teoria de reforço sináptico em decorrência da apresentação de determinado estímulo em seu trabalho intitulado “A organização do comportamento” (traduzido do original “*The Organisation of Behaviour*”). Basicamente, essa teoria sugeria que a atividade de um neurônio pré-sináptico seria capaz de promover alterações no neurônio pós-sináptico, levando a um remodelamento sináptico que poderia estar envolvido com a retenção das memórias (HEBB, 1949; JOHANSEN et al., 2011; MILNER; SQUIRE; KANDEL, 1998).

A teoria que Hebb propôs naquela época é o que hoje conhecemos por potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*). A LTP foi demonstrada experimentalmente por Bliss e Lømo em 1973 por indução artificial através de estimulações repetidas na via perforante de coelhos anestesiados. Essa estimulação aumentava o potencial excitatório de neurônios pós-sinápticos, levando a um aumento sustentado na eficiência da transmissão sináptica nas células granulares do giro denteado (BLISS; LØMO, 1973). Um pouco antes disso, em 1963, foi demonstrada a primeira evidência bioquímica envolvida com o armazenamento de memórias, quando Flexner e colaboradores demonstraram que a puromicina, uma droga que inibe a síntese de proteínas, prejudicou uma memória em camundongos, sugerindo então a necessidade de síntese de novas proteínas para a consolidação daquela memória (FLEXNER et al., 1963). Algumas décadas depois, continuando seus estudos sobre LTP, Bliss e Collingridge sugeriram que esse fenômeno eletrofisiológico seria um mecanismo sináptico básico para o armazenamento de memórias (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993).

Hoje em dia já está claro que, para que uma memória se torne fixa ou se consolide, sinapses específicas precisam ser estimuladas frente a um estímulo, desencadeando a LPT por meio da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Isso resulta em um influxo de cálcio que leva à ativação de vias intracelulares necessárias para indução de síntese proteica com consequente remodelamento sináptico e facilitação da eficácia sináptica (ABRAHAM; WILLIAMS, 2008; LÜSCHER; MALENKA, 2012). Esses mecanismos ocorrem durante um período chamado de “janela temporal” da consolidação. Após esse período no qual todo esse remodelamento sináptico acontece, o traço de memória agora se encontra armazenado de maneira estável, sendo, então, “imune” a interferências (figura 1). Essa memória pode ser

posteriormente evocada quando algum estímulo induz o acesso a essa representação neural. Todos esses processos envolvem etapas temporalmente ordenadas que culminam em eventos plásticos em redes neurais, tornando o traço de memória estável (DUDAI, 2002).

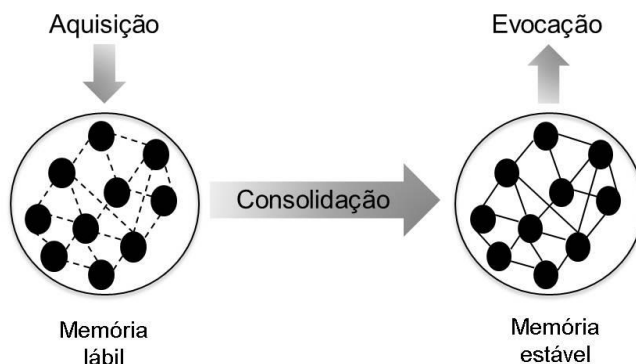


Figura 1. Representação esquemática das etapas de formação das memórias de longa duração. Após a aquisição de um aprendizado, a memória se encontra em um estado lábil, sendo necessária a sua consolidação para estabilização do traço de memória e permitir a sua evocação posterior (adaptado de GAZARINI, 2015).

Muitos estudos vêm demonstrando a ocorrência da LTP no hipocampo (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; SACCHETTI et al., 2002), mas outras regiões cerebrais também parecem apresentar processos semelhantes ao fenômeno eletrofisiológico que caracteriza a LTP, como a amígdala (ROGAN; STÄUBLI; LEDOUX, 1997) e o córtex pré-frontal medial (CPFm) (HUANG; LIN; HSU, 2007; LAROCHE; JAY; THIERRY, 1990). De fato, é bem estabelecido na literatura que são múltiplos os sistemas neurais capazes de armazenar as memórias (SQUIRE; KANDEL; EICHENBAUM, 2002) e, ainda, que esses substratos neurais são os mesmos responsáveis pelo processamento de aspectos emocionais (LEDOUX, 2000).

1.2 Memória emocional

Assim como indivíduos lembram o que estavam fazendo quando experienciaram um evento aversivo e estressante (NEISSER et al., 1996; RYB et al., 2009), roedores também lembram o local onde receberam um choque nas patas, por exemplo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; FANSELOW, 1990). Vários estudos têm demonstrado que a emoção envolvida em uma determinada situação pode afetar o processamento da memória relacionada, por isso as experiências mais relevantes passam a ser armazenadas de maneira mais intensa e duradoura (BURKE, HEUER, REISBERG, 1992; HAMANN, 2001; MCGAUGH, 2013). Essa influência ocorre por meio de interações entre regiões corticais e subcorticais do encéfalo – principalmente da amígdala com estruturas dos lobos frontal e temporal, influenciando no processamento de diversos tipos de memórias – além do recrutamento de sistemas neuro-hormonais centrais e periféricos (LEDOUX, 2000; DOLAN, 2002; MAREN; QUIRK, 2004; LABAR; CABEZA, 2006). Isso é vantajoso do ponto de vista adaptativo, uma vez que as lembranças de eventos aversivos levam à execução de comportamentos adequados para defesa e sobrevivência (MCGAUGH, 2013; JOËLS; FERNANDEZ; ROOZENDAAL, 2011).

A amígdala é uma região cerebral crucialmente envolvida com o processamento de estímulos emocionais e estressores por receber informações sobre o ambiente externo – através de projeções talâmicas e do córtex sensorial – e enviar informações através de projeções para regiões corticais – principalmente para o CPFm e hipocampo (MCGAUGH, 2013; ASEDE et al., 2015). Esse processamento se dá através do aumento de liberação de neurotransmissores e hormônios que contribuem para o reforço no armazenamento da informação, que pode ser então "espalhada" através de projeções para outras regiões cerebrais (ROOZENDAAL; McEWEN; CHATTARJI, 2009).

Concomitantemente, a capacidade cerebral de contextualizar informações permite uma enorme flexibilidade comportamental e cognitiva. Diversos estudos vêm focando no hipocampo para o processamento contextual relacionado a eventos aversivos, devido à sua importância em processar memórias episódicas e representações espaciais (HOLLAND; BOUTON, 1999). Prejuízos na memória contextual após um dano hipocampal parecem ocorrer devido à um prejuízo na formação e armazenamento de representações contextuais

(YOUNG; BOHENEK; FANSELOW, 1994; MAREN; PHAN; LIBERZON, 2013).

Além destas, é cada vez maior o interesse em investigar o papel de áreas corticais no processamento contextual do medo. Como já mencionado, algumas sub-regiões do CPFm, como o PL, parecem também ser recrutadas para o armazenamento de memórias contextuais (FRANKLAND et al., 2004; QUINN et al., 2008; ZELIKOWSKY et al., 2013).

A amígdala, o hipocampo e o CPFm, além de outras regiões cerebrais como núcleo reuniens e matéria cinzenta periaqueductal (PAG), fazem parte de um circuito recrutado para o processamento de memórias com caráter aversivo (ROZESKE et al., 2014). Alterações nesse circuito podem desencadear respostas mais robustas de medo como a generalização, que consiste na expressão de comportamentos de medo não somente frente a pistas diretamente associadas ao evento traumático, bem como frente à outras pistas sem qualquer caráter aversivo. Essa e outras respostas comportamentais de medo podem ser relacionadas com características observadas em alguns transtornos psiquiátricos como o transtorno do estresse pós-traumático (do inglês *posttraumatic stress disorder*, PTSD) (EHLERS; HACKMANN; MICHAEL, 2004; PHELPS; LEDOUX, 2005; ROZESKE et al., 2014).

1.3 A generalização do medo

Algumas abordagens experimentais podem ser propostas para propiciar um maior entendimento de características que se assemelham às observadas em transtornos psiquiátricos como o PTSD, uma vez que tanto os substratos neurais do medo quanto os mecanismos básicos de comportamentos de medo são bem conhecidos e estudados ao longo de 100 anos, além de serem bem conservados entre as espécies mamíferas. Em muitos casos de transtornos psiquiátricos, particularmente no PTSD, o evento traumático responsável por instalar o transtorno pode ser identificado. Como resultado disso, é possível melhorar o entendimento de alguns processos psicológicos e biológicos associados à respostas exacerbadas de medo, como a generalização.

Alguns estudos abordam a generalização simplesmente como uma falha na discriminação entre estímulos, no entanto, já se sabe que, em algumas situações, a generalização acontece mesmo frente a estímulos que poderiam ser facilmente distinguidos (DUNSMOOR;

MITROFF; LABAR, 2009). Por isso, é fácil imaginar que a generalização, dependendo de sua magnitude, pode levar a um estado de hipervigilância exacerbada, com respostas fisiológicas e comportamentais inadequadas (BONNE et al., 2004).

Supõe-se que respostas comportamentais exacerbadas de medo estejam relacionadas com a intensidade na qual a memória do evento traumático foi armazenada. No modelo de reforço de consolidação proposto por Pitman (1989), ele sugere que um evento traumático extremamente estressante estimula a liberação de hormônios do estresse e neuromoduladores de maneira mais intensa. Essa “superestimulação” no momento da ocorrência do trauma e nas horas subsequentes aumentaria a retenção dessa memória aversiva por potencializar também processos que ocorrem durante a consolidação da memória traumática. Pitman sugere que a memória relacionada à um evento traumático é retida de maneira mais intensa. A resposta exagerada de neuromoduladores que ocorre em decorrência da situação aversiva ou traumática reforça a associação entre o evento e a emoção envolvida, fazendo com que essas memórias sejam mais bem lembradas e resultando em respostas exageradas ou potencializadas, mesmo frente à pistas não associadas ao evento aversivo. De fato, corroborando com a teoria de Pitman, estudos com roedores demonstram que o aumento da intensidade do aprendizado aversivo resulta na expressão da generalização do medo frente à pistas neutras (BALDI et al., 2004; GAZARINI et al., 2013; 2014; GHOSH; CHATTARJI, 2015).

1.4 O estudo das memórias aversivas – condicionamento clássico pavloviano

Quase 100 anos atrás, o russo Ivan Pavlov (1927) demonstrou que cães eram capazes de aprender a usar uma pista neutra para prever um evento biologicamente relevante: depois de associações repetidas entre um estímulo condicionado (um som de uma sineta) com um estímulo incondicionado (um pedaço de carne), os cães eram condicionados a antecipar o recebimento do alimento com o som da sineta. Ou seja, ao ouvir a sineta, os cães respondiam com um aumento na salivação, mesmo que na ausência do alimento. Esse condicionamento reflete a expressão comportamental de uma memória associativa apetitiva (PAVLOV, 1927). Nesse sentido, situações aversivas também compreendem um estímulo biologicamente relevante,

sendo que pistas neutras podem adquirir uma valência emocional quando elas predizem um risco à sobrevivência e, uma vez que tenham sido associadas ou “pareadas” com um evento aversivo, desencadeiam respostas comportamentais que, nesse caso, são de defesa ou medo.

O condicionamento de medo – que é baseado no condicionamento clássico proposto por Pavlov – é uma forma de aprendizado associativo bastante utilizado em muitas espécies para o estudo das memórias aversivas (KIM; JUNG, 2006). O paradigma consiste em associar um estímulo condicionado ou neutro (EC) com um estímulo incondicionado ou aversivo (EI). Sons e contextos estão entre os EC mais utilizados. Já o EI mais utilizado nesse paradigma é o choque nas patas, embora outros também possam ser adotados, como o odor do predador (BLANCHARD et al., 2001), estimulação direta de estruturas encefálicas relacionadas ao medo (PAVESI, CANTERAS, CAROBREZ, 2011; KINCHESKI et al., 2012) ou indução de estados de ansiedade (GUITTON; DUDAI, 2004; CAVALLI, BERTOGLIO, CAROBREZ, 2009). O EC e o EI podem recrutar vias neurais específicas diferentes para seu processamento; por isso, diferentes estruturas cerebrais podem ser recrutadas de acordo com o protocolo adotado (LEDoux, 2000). A associação entre o EC e o EI é que leva a aquisição de um aprendizado entre esses dois estímulos e seu subsequente armazenamento, que desencadeia respostas comportamentais de medo quando o roedor se depara novamente com o EC.

Um protocolo de condicionamento de medo contextual permite que se estude facilmente as diversas etapas da formação de uma memória de medo em roedores. Em um primeiro momento, o animal é colocado em uma caixa por um tempo determinado para a aquisição da representação espacial (FANSELOW, 2000). No dia seguinte, o roedor é colocado novamente nessa caixa e recebe os choques nas patas. O roedor apresenta uma atividade locomotora vigorosa durante a apresentação dos choques (FANSELOW, 1982), que vai diminuindo e sendo gradualmente substituída por uma profunda imobilidade ou congelamento (*freezing*). Esse comportamento – também chamado de resposta condicionada – consiste na cessação de todos os movimentos, exceto os de respiração (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969).

Muitos modelos animais utilizam paradigmas que propiciam a formação de memórias de medo traumáticas, como o condicionamento clássico de medo associado com protocolos de estresse (PARK; CAMBPELL; DIAMOND, 2001; COHEN et al., 2004; YEHUDA;

LEDOUX, 2007; ZOLADZ et al., 2008; ZOLADZ; FLESHNER; DIAMOND, 2012; DASKALAKIS; YEHUDA; DIAMOND, 2013; PARSONS; RESSLER, 2013) ou com administração de drogas que potencializam processos de memória (KAOUANE et al., 2012; GAZARINI et al., 2013; 2014). Esses modelos desencadeiam níveis elevados de comportamentos relacionados à ansiedade e medo persistente, incluindo a generalização, quando comparados com grupos experimentais que não passaram pelo estresse ou indução farmacológica, sugerindo que a incapacidade de inibição do medo nesses modelos pode ser um aspecto comparável ao observado no PTSD (JOVANOVIC; RESSLER, 2010). Trabalhos anteriores e atuais do nosso laboratório vêm demonstrando o potencial efeito da ioimbina na indução da generalização do medo em ratos (GAZARINI et al., 2013; 2014). A ioimbina reverte a ação inibitória mediada pelos receptores α -adrenérgicos pré-sinápticos e estimula o *locus coeruleus*, aumentando os níveis de noradrenalina no cérebro (IVANOV; ASTON-JONES, 1995), que é um neurotransmissor crucial na regulação de memória e emoções, além de sua influência na atividade neuronal do córtex PL (McINTYRE et al., 2012; FITZGERALD et al., 2015). Essa ferramenta farmacológica, quando administrada imediatamente após o condicionamento de medo contextual, leva à ocorrência de generalização, além de prejuízos de extinção e resistência ao prejuízo de reconsolidação por agentes amnésicos (GAZARINI et al., 2013; 2015), além de mimetizar uma importante característica do PTSD que é o aumento do tônus noradrenérgico durante a consolidação da memória aversiva relacionada a um trauma (GERACIOTI et al., 2001; GERACIOTI et al., 2008).

Alguns pesquisadores sugerem que as memórias traumáticas relacionadas à transtornos psiquiátricos sejam um tanto quanto diferentes das memórias de medo adaptativas, sendo essa memória traumática considerada *anormal* e que envolve mecanismos neurobiológicos diferentes de uma memória *normal e adaptativa* (DESMEDT; MARIGHETTO; PIAZZA, 2015). No entanto, é difícil determinar se as alterações comportamentais observadas em modelos pré-clínicos são, de fato, aspectos relacionados a um fenótipo tipo-PTSD ou se são simplesmente respostas comportamentais adaptativas (YEHUDA; LEDOUX, 2007).

O condicionamento de medo é um modelo bastante relevante para o estudo de memória e aprendizado considerados adaptativos ou normais. Em contraste, uma memória relacionada ao PTSD é

considerada descontextualizada e leva à lembranças intrusivas do evento aversivo frente à ambientes seguros. Cabe ressaltar que a capacidade de generalizar respostas frente à outros estímulos não necessariamente associados ao evento aversivo é importante em algumas situações e pode ser tido como “adaptativo”, por isso, a distinção comportamental entre respostas “adaptativas” e “mal adaptativas” pode ser um desafio. A comparação comportamental e molecular entre esses dois estados deveria permitir identificar quais alterações neurobiológicas poderiam constituir biomarcadores e mecanismos patofisiológicos das memórias ditas mal adaptativas.

Respostas aumentadas de medo induzidas em roedores – desencadeadas por uma memória de medo ainda mais relevante – podem compreender, além da generalização dessa resposta de medo frente à pistas neutras (WANG et al., 2008; COSTANZI et al., 2014), a sensibilização da resposta (RAU; DECOLA; FANSELOW, 2005) e prejuízo na aquisição e/ou consolidação da memória de extinção (LANIUS et al., 2010; JOVANOVIĆ; NORRHOLM, 2011; PITMAN et al., 2012; ANDERO; RESSLER, 2012). Em geral, a magnitude e persistência da resposta de medo são consideradas critérios cruciais para o estudo das memórias traumáticas. No entanto, outros aspectos qualitativos, como sua evocação frente à pistas irrelevantes – o que caracteriza a generalização –, nem sempre é levada em consideração em muitos estudos.

Embora ainda não se tenha uma nomenclatura bem definida para as memórias traumáticas que desencadeiam, em roedores, características relacionadas a alguns transtornos psiquiátricos, alguns autores a classificam como memória disfuncional (CAIN; MAYNARD; KEHNE, 2012; HIRSCH et al., 2015), memória anormal (DESMEDT; MARIGHETTO; PIAZZA, 2015), memória patológica (PARSONS; RESSLER, 2013), memória aberrante (SCHUWABE; NADER; PRUESSNER, 2014) ou memória mal adaptativa (ITZHAK; PEREZ-LANZA; LIDDIE, 2014). No presente trabalho, optou-se por utilizar o termo “**memória potencializada**”, embora seja claro que esse termo ainda carece de discussões mais aprofundadas e esclarecedoras.

A potencialização de uma memória aversiva nos protocolos de condicionamento de medo pode ser útil para o estudo de possíveis intervenções que objetivam mitigar essa memória e atenuar as características de respostas de medo exacerbadas, como a generalização. Nesse contexto, a facilitação da extinção e o prejuízo de reconsolidação da memória aparecem como uma abordagem promissora (DEACON;

ABRAMOWITZ, 2004; MILAD; ROSENBAUM; SIMON, 2014), mesmo sendo essas memórias potencializadas menos susceptíveis à estas intervenções (JOVANOVIĆ et al., 2010; BUSTOS et al., 2010; JOVANOVIĆ; NORRHOLM, 2011;GAZARINI et al., 2014).

1.5 A extinção da memória de medo

Se um estímulo condicionado é repetidamente e/ou prolongadamente apresentado na ausência do estímulo incondicionado, a resposta comportamental relacionada ao pareamento entre esses estímulos gradualmente diminui. Esse processo é conhecido como extinção do medo; ou seja, quando o EC não mais prediz o EI, a resposta condicionada está extinta (VAN ELZAKKER et al., 2014). Apesar do termo sugerir, a extinção não é um apagamento da memória de medo, e sim, tem sua expressão temporariamente suprimida enquanto uma nova memória é formada (QUIRK et al., 2010).

A extinção tem sido uma abordagem amplamente utilizada para minimizar o impacto das memórias traumáticas. No entanto, esse processo apresenta uma forte limitação, que é o retorno do medo por meio de recuperação espontânea, reinstalação e renovação do medo. Por isso as pesquisas nesse âmbito vêm focando em drogas capazes de potencializar processos de extinção (ALBERINI; LEDOUX, 2013), embora as limitações supracitadas ainda possam ocorrer.

A literatura sugere que uma das características apresentadas por pacientes com PTSD é a apresentação continuada de respostas de medo durante e após um aprendizado de extinção (GUTHRIE; BRYANT, 2006; JOVANOVIĆ et al., 2009; 2012; MILAD et al, 2006; QUIRK; GARCIA; GONZALEZ-LIMA, 2006; RAUCH; SHIN; PHELPS, 2006; ROTHBAUM; DAVIS, 2003; MYERS; DAVIS, 2007; CAIN; MAYNARD; KEHNE, 2012). Da mesma forma, estudos com roedores também demonstram que memórias cuja consolidação é reforçada por protocolos de estresse ou indução farmacológica que levam à generalização também apresentam um prejuízo de extinção (GAZARINI et al., 2014). Anormalidades no processo de extinção são relacionadas com alterações na circuitaria do medo: um aumento da atividade do córtex PL (BURGOS-ROBLES; VIDAL-GONZALEZ; QUIRK, 2009) e da amígdala (MYERS; DAVIS, 2007) é observado em casos de prejuízo de extinção. Estudos de neuroimagem em humanos com transtornos psiquiátricos que envolvem respostas exacerbadas de medo

apresentam alta responsividade da amígdala e córtex cingulado anterior dorsal (região homóloga ao PL em roedores), enquanto que as regiões cerebrais que inibem o medo, como o córtex pré-frontal ventromedial (região homóloga ao IL) e hipocampo aparecem inibidas (BREMNER et al., 2005; MILAD et al., 2009).

A avaliação do funcionamento de regiões cerebrais como hipocampo, amígdala e CPFm, que estão envolvidas na circuitaria do medo (SOTRES-BAYON; BUSH; LEDOUX, 2004; 2006) é crucial para a busca do entendimento dessas memórias potencializadas. Vários modelos animais têm sido desenvolvidos para modelar o prejuízo de extinção; dentre eles, o uso de estresse prévio ao condicionamento aversivo (YAMAMOTO et al., 2008), roedores selecionados para apresentarem altos níveis de comportamentos tipo ansiedade (MUIGG et al., 2008) ou desamparo aprendido (WRUBEL et al., 2007). Sendo esta uma característica observada em transtornos psiquiátricos como o PTSD, mimetizá-la em modelos animais é relevante para posterior estudo da neurobiologia dessas memórias traumáticas, além de auxiliar a identificar novos possíveis alvos para tratamentos baseados na sua facilitação (HOLMES; QUIRK, 2010).

1.6 Modificando o que foi armazenado – a reconsolidação

Depois que a teoria da consolidação foi proposta, acreditou-se durante muito tempo que a memória, ao ser consolidada, não poderia mais ser modificada. No entanto, nas décadas de 60 e 70, foi demonstrado que agentes amnésicos eram capazes de provocar seus efeitos em memórias já consolidadas, quando o tratamento era feito após a sua evocação (MISANIN et al, 1968; MACTUTUS et al, 1979). No entanto, esse tema foi deixado de lado e apenas em 1997, ele foi retomado com a demonstração de que uma memória espacial de ratos poderia ser prejudicada após a sua evocação (PRZYBYSLAWSKI; SARA, 1997). Não se sabe ao certo quando o termo “reconsolidação” foi cunhado, mas ele se tornou bastante proeminente após uma revisão publicada por Susan Sara no ano 2000, que utilizou esse termo para descrever as modificações e reorganizações de uma memória evocada, sugerindo a ocorrência de processos muito mais dinâmicos do que se acreditava até então (SARA, 2000a). O termo também foi usado por Karin Nader e colaboradores no mesmo ano, ganhando maior visibilidade na área (NADER; SCHAFE; LEDOUX, 2000a; 2000b). Ao

longo dos anos subsequentes, muitos experimentos suportaram a susceptibilidade da memória à agentes amnésicos após a apresentação de um "lembrete"; resultados extensivamente revisados em artigos recentes (NADER; HARDT, 2009; DUDAI; EISENBERG, 2004; LEE, 2010; SARA, 2010; ALBERINI, 2011).

Apesar do nome, a "reconsolidação" não é uma simples recapitulação da consolidação, mas se caracteriza por um processo distinto embora se assemelhe à consolidação em termos de função e alguns mecanismos moleculares (DUDAI, 2006). Hoje já se sabe que o processo de reconsolidação de uma memória depende de um processo inicial de desestabilização da memória previamente consolidada, que envolve degradação proteica; seguido por uma fase de reestabilização dependente de nova síntese de proteínas (NADER; SCHAFE; LEDOUX, 2000b; TRONSON; TAYLOR, 2007). Para que uma memória previamente consolidada seja evocada, é necessária a reexposição breve de um "lembrete", que pode fazer com que ela se torne novamente lábil ou instável, através da reativação da rede neural originalmente consolidada. Depois de lábil, essa memória precisa ser novamente armazenada (figura 2). Ou seja, uma nova onda de síntese proteica é necessária para reestabilizar – ou reconsolidar – essa mesma memória.

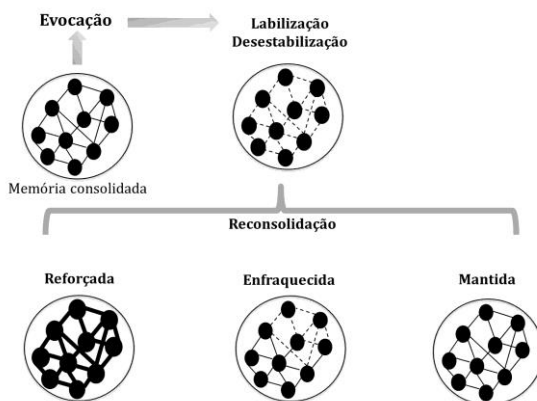


Figura 2. Representação esquemática da reconsolidação como uma nova etapa de estabilização das memórias. Frente à evocação da memória, ela é reativada e pode ser desestabilizada, sendo necessária a sua reconsolidação para retornar à um estado estável (Besnard et al, 2012; Lee et al, 2012).

Lee (2008) demonstrou que um segundo aprendizado reforça a memória de medo contextual utilizando inibidores de BDNF e de Zif268, marcadores relacionados à consolidação e reconsolidação, respectivamente (LEE et al., 2004; LEE, 2008). Ele demonstrou que a injeção de um antisense para BDNF no hipocampo antes do segundo aprendizado não alterava a retenção da memória. No entanto, a injeção de zif268 feita antes do segundo aprendizado prejudicava completamente a retenção da memória. A literatura demonstra alguns outros mecanismos de reconsolidação que diferem de mecanismos recrutados para a consolidação (TAUBENFELD et al., 2001; LEE et al., 2004; TRONEL; MILEKIC; ALBERINI, 2005; VON HERTZEN; GIESE, 2005). No entanto, é importante ressaltar que alguns mecanismos são comuns para os dois processos de memória, como por exemplo, a necessidade da síntese de novas proteínas (ALBERINI, 2005). Além disso, dependendo do tipo de memória, a reconsolidação e a consolidação podem ser processadas pelas mesmas regiões cerebrais, como é o caso do hipocampo e da amígdala (NADER; HARDT, 2009). Recentemente, nosso laboratório demonstrou o papel da porção pré-límbica (PL) do córtex pré-frontal medial (CPFm) na reconsolidação de uma memória de medo contextual (STERN et al., 2014, que também é importante para a consolidação (TRONEL; SARA, 2003; CHOI et al., 2010; CHOI; GOURLEY; RESSLER, 2012; ZELIKOWSKY et al., 2013; XUE et al., 2015).

Um dos possíveis papéis funcionais do processo de reconsolidação é mediar a manutenção de uma memória, através do reforço ou *updating*. As memórias são reativadas em situações que apresentam informações adicionais ou complementares, e a capacidade para alterações plásticas de reforço de memória parece ser potencialmente importante em termos de manutenção da relevância de uma determinada memória, de forma a guiar o comportamento e prevenir o esquecimento (ALBERINI, 2011). No entanto, o reforço de reconsolidação apresenta uma importante implicação clínica: memórias aversivas ou traumáticas, quando evocadas com frequência, são subsequentemente reconsolidadas, podendo ser este o mecanismo pelo qual se instalam alguns transtornos psiquiátricos (PITMAN; DELAHANTY, 2005).

Por outro lado, levando em conta essa nova janela instável da memória, o fenômeno da reconsolidação nos permite buscar novas estratégias para prejudicar ou enfraquecer as memórias aversivas (SARA, 2000a; DUDAI, 2004; CAIN; MAYNARD; KEHNE, 2012;

PARSONS; RESSLER, 2013; ALBERINI; LEDOUX, 2013; SCHWABE; NADER; PRUESSNER, 2014). Em um protocolo experimental, quando o EC é brevemente apresentado depois que a memória já foi consolidada, essa mesma memória pode ser reativada, passando para um estado lábil. Nessa fase, o bloqueio da reconsolidação pode ser realizado utilizando algum agente farmacológico (GAMACHE; PITMAN; NADER, 2012; KINDT; SOETER; VERVLiet; 2009; NADER; HARDT, 2009; NADER; SCHAFE; LE DOUX; 2000; PITMAN; STERN et al., 2012) ou um protocolo de extinção dentro da janela de reconsolidação (MONFILS et al., 2009).

Vários agentes farmacológicos prejudicam a reconsolidação de uma memória aversiva, como o benzodiazepínico midazolam (BUSTOS et al., 2006). Recentemente, nosso laboratório demonstrou esse efeito para o canabidiol (CBD), um fitocanabinoide proveniente da *Cannabis sativa*, que favorece a ativação indireta de receptores canabinoides do tipo 1 (STERN et al., 2012). Nesse trabalho, a administração sistêmica de CBD imediatamente após a reativação prejudicou a reconsolidação de uma memória de medo contextual em níveis significativamente maiores que o midazolam.

No que concerne às memórias traumáticas mais robustas, alguns agentes amnésicos têm se mostrado aparentemente ineficazes no prejuízo de reconsolidação. Memórias cuja consolidação é reforçada por um estresse prévio apresentam-se resistentes ao prejuízo de reconsolidação induzido pelo midazolam (BUSTOS et al., 2010). Dados do nosso laboratório também demonstraram que uma memória potencializada pela hiperativação noradrenérgica durante a consolidação também é resistente ao prejuízo de reconsolidação induzido pelo canabidiol (GAZARINI et al., 2014). Entender e buscar reverter essas condições limitantes é crucial para minimizar o impacto negativo dessas memórias.

1.7 A labilização das memórias

A sessão de evocação permite que aconteça a labilização da memória, um processo determinante para a indução da reconsolidação (ALBERINI, 2011; MERLO et al., 2014) (figura 3). O primeiro estudo que mostrou que a labilização também poderia ser bloqueada foi realizado por Ben Mamou e colaboradores (2006). Eles demonstraram que a infusão pré-reativação de ifenprodil, um antagonista da subunidade GluN2B dos receptores NMDA, prevenia o efeito amnésico

do inibidor de síntese proteica anisomicina (BEN MAMOU et al., 2006). Um pouco mais tarde, Lee e colaboradores (2008) mostraram a importância do sistema ubiquitina-proteassoma na labilização, uma vez que a injeção intrahipocampal do inibidor de proteassoma β -lactacistina prevenia o bloqueio de reconsolidação induzido por anisomicina. No mesmo ano, Suzuki e colaboradores (2008) demonstraram o papel dos canais de cálcio voltagem dependente tipo L e também dos receptores canabinóides tipo 1 (CB1) na indução da labilização. Desde então, diversos outros estudos vêm focando não só no processo de reconsolidação *per se*, como também na indução da labilização como etapa determinante para a reconsolidação acontecer (JAROME et al., 2011; KIM et al., 2011; de OLIVEIRA ALVARES et al., 2013; MILTON et al., 2013; HONG et al., 2013; FUKUSHIMA et al., 2014).

Alguns trabalhos assumem que as memórias potencializadas apresentam uma resistência à labilização (BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2014; ORTIZ et al., 2015), como mostra a figura 3. Bustos e colaboradores (2010) demonstraram que a D-cicloserina (DCS), um agonista parcial do sítio da glicina do receptor NMDA, resgata o efeito amnésico de drogas nas memórias resistentes ao prejuízo de reconsolidação, quando administrada antes da sua reativação. No caso dessas memórias potencializadas, esse agente favorece o efeito de drogas amnésicas na reconsolidação supostamente por facilitar a labilização e permitir a consequente reconsolidação (GAZARINI et al., 2014).

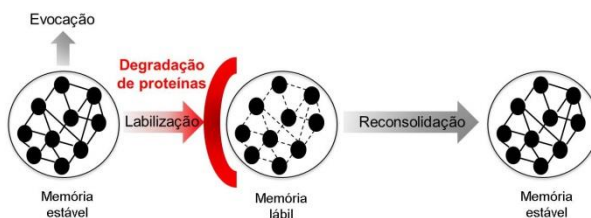


Figura 3. A labilização como peça chave na indução da reconsolidação. Durante a evocação, a memória que se encontrava em um estado estável passa para um estado lábil, com posterior reconsolidação (do autor).

O processo de labilização parece ocorrer de maneira distribuída no cérebro. Alguns trabalhos já demonstraram a manipulação da labilização de maneira sistêmica (de OLIVEIRA ALVARES et al.,

2013), intra-amígdala (JAROME et al., 2011) e intra-hipocampo (LEE et al., 2008). Evidências parecem sugerir que as regiões cerebrais envolvidas com a labilização de memórias podem ser as mesmas envolvidas também na consolidação, reconsolidação e, mais especificamente, evocação – já que, durante esse processo, a labilização pode ser desencadeada.

Sendo assim, mais do que focar em processos de extinção e reconsolidação, uma maior importância para a ocorrência da labilização é crucial, visto que é esse processo que permite que a reconsolidação da memória aconteça, e que efeitos amnésicos desencadeados por agentes farmacológicos visando a redução da magnitude negativa da mesma possam ser obtidos.

1.8 O córtex pré-frontal medial

Ao longo dos anos, muitos estudos têm oferecido um melhor entendimento de circuitos neurais e mecanismos envolvidos na formação e expressão das memórias de medo. Apesar do papel bem conhecido do hipocampo e da amígdala no processamento dessas memórias aversivas, evidências crescentes indicam que regiões específicas do CPFm regulam diferencialmente a aquisição e o armazenamento do medo contextual, levando à expressão comportamental dessas memórias (EINARSSON; NADER, 2012; GONZALEZ et al., 2013; ROZESKE et al., 2014).

Existe atualmente uma vasta literatura atribuindo ao CPFm uma variedade de funções relacionadas ao controle de comportamento, incluindo a regulação emocional (PITMAN et al., 2012; ROY; SHOHAMY; WAGER, 2012), tomada de decisões (EUSTON; GRUBER; MCNAUGHTON, 2012; WOOD; VER HOEF; KNIGHT, 2012) e codificação contextual (HYMAN et al., 2012).

Em roedores, o CPFm é dividido em três áreas distintas que são, no sentido dorsoventral, o córtex cingulado anterior (CA), o córtex pré-límbico (PL) e o córtex infra-límbico (IL) (figura 4). Essas três sub-regiões conectam-se com a amígdala: o IL é fortemente conectado com as células intercalares da cápsula lateral da amígdala, que são neurônios GABAérgicos e, portanto, inibitórios. Já o PL e o CA enviam projeções excitatórias principalmente para o núcleo basolateral da amígdala (VERTES, 2004). Considerando o papel da amígdala no processamento do medo, o PL e o CA estimulam sua atividade de forma a “ligar o

medo”, enquanto que o IL reduziria essa resposta (PETERS; KALIVAS; QUIRK, 2009) (figura 5).

O CPFm também recebe projeções da região CA1 do hipocampo. As projeções do CPFm para o hipocampo não são diretas, mas se dão pelo relê talâmico, via núcleo reuniens. O hipocampo é uma região cerebral crucial para o processamento contextual (CORCORAN, MAREN, 2001; MAREN, HOBIN, 2007), no entanto, o PL também exerce um papel chave nesse processamento (KIM et al., 2013; ZELIKOWSKY et al., 2013). Estudos antigos e também mais recentes evidenciam o papel do CPFm no armazenamento de memórias remotas e sua consolidação sistêmica – processo de reorganização do armazenamento de memórias ao longo do tempo (BONTEMPI et al., 1999; FRANKLAND et al., 2004; FRANKLAND; BONTEMPI, 2005). De acordo com essa teoria, ao longo do tempo as memórias se tornam gradualmente menos dependentes do hipocampo e mais dependentes do CPFm (CHOI et al., 2010; ZHANG, FUKUSHIMA, KIDA, 2011; EINARSSON; NADER, 2012), que passa a processar aspectos da representação contextual da memória e mecanismos de LTP necessários para tal (LIM et al., 2010; SAKATA et al., 2013). Estudos mais recentes, no entanto, vêm demonstrando que, na prática, as duas estruturas são recrutadas tanto para o processamento recente quanto remoto de memórias aversivas (ZELIKOWSKI et al., 2013; TANAKA et al., 2014).

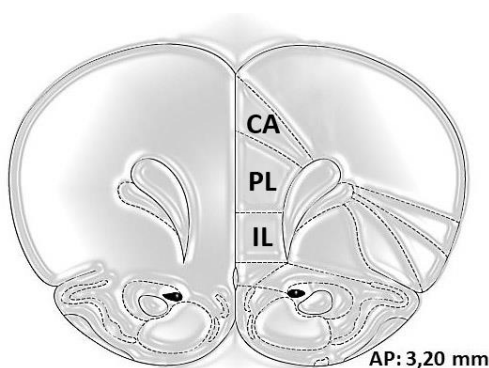


Figura 4. Representação esquemática das sub-regiões do córtex pré-frontal medial de ratos em um corte coronal. CA: córtex cingulado anterior; PL: córtex pré-límbico; IL: córtex infra-límbico; AP: ântero-posterior (Adaptado de PAXINOS; WATSON, 2009).

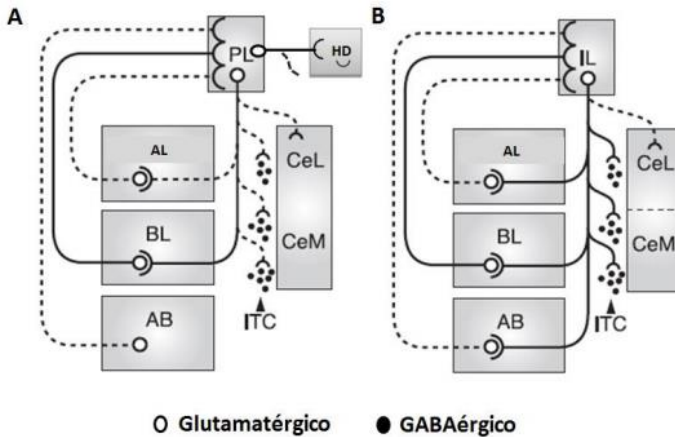


Figura 5. Conexões entre as regiões do córtex pré-frontal medial. (A) O córtex pré-límbico (PL) recebe projeções excitatórias do hipocampo dorsal (HD) e envia projeções excitatórias para a amígdala basolateral (BL), a qual estimula a amígdala central (CeL e CeM), aumentando o medo. O PL envia, ainda, poucas projeções para as células intercaladas da amígdala (ITC), as quais são interneurônios GABAérgicos que inibem a atividade da CeL e CeM. (B) O córtex infralímbico (IL) envia projeções para as ITC, inibindo a CeL e CeM, reduzindo o medo. AL: amígdala lateral; AB: núcleo acessório basal. As linhas cheias indicam projeções mais densas. As linhas pontilhadas indicam as projeções mais fracas. (Adaptado de PAPE; PARE, 2010).

O CPFm também se conecta com a área tegmental ventral, núcleos da base e regiões dorsal e lateral da matéria cinzenta periaqueductal, que é classicamente envolvida no controle de comportamentos defensivos. Por fim, o CPFm contém ainda importantes conexões internas, com o PL projetando para a porção ventral do CA e o IL projetando preferencialmente para o CA dorsal (HOOVER, VERTES, 2007). Dadas as conexões descritas acima, o córtex pré-frontal é idealmente posicionado para receber e modular informações espaciais e emocionais provenientes de regiões cerebrais implicadas no processamento de medo contextual.

A especificidade sub-regional do CPFm quanto às conexões anatômicas é uma das características que nos permite apontar o PL como peça chave no processamento das memórias. De fato, alguns estudos demonstram um envolvimento do PL na consolidação de memórias aversivas: a inibição da síntese proteica no PL prejudica um

aprendizado de medo (REIS; JAROME; HELMSTETTER, 2013); sendo que esse aprendizado de medo requer a síntese de BDNF (CHOI et al, 2010) e expressão da proteína quinase M ζ (XUE et al., 2015) no PL. Adicionalmente, a ativação dos receptores adrenérgicos do tipo β 2 presentes no PL potencializa a consolidação de uma memória de medo via sinalização cAMP-PKA (ZHOU et al., 2013). Esses estudos demonstram um papel importante do PL como um local para o armazenamento de memórias.

Experimentos que examinam a marcação citoplasmática e nuclear de Arc (do inglês, “*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*”) – uma proteína de função estrutural com expressão imediata frente a eventos que levam à plasticidade neuronal (KORB; FINKBEINER, 2001) e atividade relacionada ao remodelamento sináptico e tráfego de receptores glutamatérgicos (BRAMHAM et al., 2008) – reforçam a ideia que o córtex PL está envolvido na consolidação de memórias de medo contextual. A exposição ao contexto, bem como a associação do contexto com uma pista aversiva, ativa o PL, mas não o IL (ZELIKOWSKY et al., 2014). Uma ativação massiva do córtex PL é observada durante e após um condicionamento de medo (TRONEL; SARA, 2003), que se confirma por um estudo eletrofisiológico mostrando a ativação de neurônios do córtex PL durante o aprendizado de medo (KUBLIK; SARA, 2002). Esses dados oferecem evidências de que o PL serve como uma região cerebral na qual as informações provenientes da amígdala e do hipocampo são processadas durante e após o condicionamento.

Embora se tenha ainda pouco conhecimento acerca da circuitaria neural da generalização (VIEIRA ET AL., 2014; XU; SÜDHOF, 2013), algumas linhas de evidência sugerem que a mesma circuitaria do medo proposta em estudos com animais se mostra com funcionamento alterado em quadros de transtornos psiquiátricos como o PTSD (PITTENGER, 2013). Nesses casos, pacientes demonstram um aumento na atividade do córtex cingulado dorsal anterior (região homóloga ao CA e PL em roedores) durante a expressão exacerbada de medo (ROUGEMONT-BÜCKING et al., 2011; PITMAN et al., 2012; SHIN; RAUCH; PITMAN, 2006). Para embasar esses achados clínicos, um estudo realizado em roedores demonstrou que a atividade do CA está envolvida com a generalização do medo (EINARSSON et al., 2015), possivelmente por regular essa resposta emocional através de suas conexões com a amígdala (ROZESKE et al., 2015), que também está envolvida com a generalização (BERGADO-ACOSTA et al., 2008;

GHOSH; CHATTARJI, 2015). No entanto, a pesquisa básica ainda é escassa para subsidiar o envolvimento do CPFm e mecanismos recrutados para a ocorrência desse fenômeno, embora seja possível sugerir um envolvimento importante do PL, considerando seu papel no armazenamento de memórias e na expressão do medo.

1.9 Receptores NMDA e o córtex pré-frontal medial

Os receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA são complexos heterotetraméricos compostos a partir de sete subunidades (NR1, NR2A-D, NR3A e B) que constituem canais de cátions ligados pelo neurotransmissor excitatório glutamato, mediando a transdução de sinal nas sinapses. A funcionalidade do receptor depende de uma composição mínima de duas subunidades NR1 e duas subunidades NR2, uma vez que sua ativação depende da ligação de dois co-agonistas (a glicina além do glutamato), nos seus respectivos sítios de ligação presentes nas subunidades NR1 e NR2 (OGDEN; TRAYNELIS, 2011). Diversos estudos mostram a alta densidade desses receptores em regiões importantes para o processamento de memórias aversivas, como o hipocampo e o córtex, bem como a importância desses receptores nos processos de plasticidade sináptica associados com aprendizado e memória (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; JAY; BURETTE; LAROCHE, 1995; BERGINK; MEGEN; WESTENBERG, 2004). As subunidades NR2A e B são predominantemente expressas no cérebro e determinam muitas das funções dos receptores NMDA (LOFTIS; JANOWSKY, 2003).

Estudos vêm demonstrando um papel crucial dos receptores NMDA presentes no córtex PL no processamento de aprendizado e memória (TRONEL; SARA, 2003; GILMARTIN; HELMSTETTER, 2010; GILMARTIN et al., 2013), pânico (DE FREITAS et al., 2014) e ansiedade (STERN et al., 2010). Como é amplamente sabido que os processos de LTP são necessários para a formação de memórias, a hipótese de um papel para os receptores NMDA na formação de memórias pelo córtex PL é inevitável. Evidências suportam essa hipótese, uma vez que o antagonismo desses receptores no córtex PL é capaz de bloquear a indução de LTP e prevenir a formação de memórias aversivas (TRONEL; SARA, 2003). Além disso, receptores NMDA contendo a subunidade NR2A, no PL, são necessários tanto para o condicionamento à pista quanto para o contextual, um padrão

semelhante ao que ocorre no hipocampo (GILMARTIN; KWAPIS; HELMSTETTER, 2013). Estudos têm demonstrado que a infusão de NMDA é suficiente para estimular a atividade de regiões cerebrais como a matéria cinzenta periaqueductal, promovendo a formação e reforço de memória, bem como a expressão de comportamentos defensivos (RESSTEL et al., 2006; MORAES; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2008; KINCHESKI; CAROBREZ, 2010; MOCHNY et al., 2013). Assim, optou-se no presente estudo por utilizar essa ferramenta farmacológica, com o objetivo de potencializar a atividade do córtex PL durante o processamento de uma memória aversiva.

2. HIPÓTESE

Além das evidências de que a intensidade do evento aversivo influencia na ocorrência da generalização do medo (BALDI et al., 2004; GAZARINI et al., 2014), sabe-se também que o PL de roedores apresenta-se hiperativado em situações de medo intenso (PETERS; KALIVAS; QUIRK, 2009), assim como acontece também com a região homóloga em humanos (ROUGEMONT-BÜCKING et al., 2011). Sendo assim, a hipótese desse trabalho é que a potencialização da atividade do córtex PL durante o condicionamento de medo contextual reforça a consolidação da memória e leva à ocorrência de generalização do medo, menor propensão à extinção e resistência ao prejuízo de reconsolidação pelo canabidiol, características de memórias potencializadas que poderiam ser amenizadas pela facilitação da labilização.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o papel da porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial na generalização de uma memória de medo contextual.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o efeito da microestimulação do córtex pré-límbico na indução da generalização do medo;
- Confirmar a relação entre ocorrência da generalização do medo com facilitação da consolidação da memória de medo contextual;
- Investigar a expressão de Arc no PL, após sua microestimulação, durante a consolidação da memória de medo contextual;
- Avaliar a influência do protocolo de condicionamento e da intensidade da microestimulação do córtex PL na duração da generalização do medo;
- Investigar se a microestimulação do córtex pré-límbico durante a consolidação da memória de medo contextual interfere com o comportamento de esquiva no labirinto em cruz elevado;
- Avaliar o papel do córtex pré-límbico na generalização do medo induzida pelo antagonista de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos ioimbina;
- Investigar se a microestimulação do córtex pré-límbico durante a reconsolidação da memória de medo contextual induz a generalização do medo;
- Investigar se a memória potencializada é menos propensa à extinção;

- Testar se a memória potencializada é susceptível ao efeito amnésico do canabidiol na reconsolidação;
- Investigar a influência da facilitação da labilização por D-cicloserina no efeito amnésico do canabidiol na reconsolidação da memória potencializada;
- Investigar a influência do aumento do tempo da sessão de evocação no efeito amnésico do canabidiol na reconsolidação da memória potencializada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

O trabalho foi realizado mediante aprovação do comitê de ética para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (Ofício nº71/CEUA/PRPE/2012-PP00766). O tamanho da amostra foi o mínimo suficiente para a obtenção de análises estatísticas fidedignas.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, machos, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina, com 3 a 4 meses de idade e peso entre 270 e 350 g. Durante o período de permanência no biotério, eles foram alojados em gaiolas plásticas padrão (36 x 30 x 15 cm), contendo cinco ratos cada. Os animais tiveram acesso à água e comida *ad libitum* e a temperatura ambiente foi mantida em 22 ± 1 °C, com ciclo de luz claro/escuro de 12 h (início às 07:00 h).

4.3 Drogas

NMDA (agonista de receptores glutamatérgicos NMDA; 30-300 pmol/0,2 µl/hemisfério; Sigma, EUA), dissolvido em PBS. As concentrações foram selecionadas com base em trabalhos prévios da literatura que utilizaram essa ferramenta farmacológica para microestimulação cerebral (MORAES; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2008; KINCHESKI; CAROBREZ, 2010; MOCHNY et al., 2013).

Hidrocloreto de ioimbina (IOI; antagonista de receptores auto-inibitórios α 2-adrenérgicos; 2,0 mg/kg; Tocris, EUA), dissolvida em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) e administrada sistemicamente (i.p.) em um volume de 1,0 ml/kg. A dose foi selecionada com base em experimentos preliminares e trabalhos prévios do nosso laboratório (GAZARINI et al., 2013; GAZARINI et al., 2015).

Muscimol (MUS; agonista GABAérgico; 4,0 nmol/0,2 µl/hemisfério; Sigma, EUA) foi dissolvido em PBS. A dose utilizada foi baseada em trabalhos prévios (SHAH; SJOVOLD; TREIT, 2004, STERN et al., 2014).

Canabidiol (CBD; agonista indireto de receptores canabinóides tipo 1; 10 mg/kg; THC-Pharma, Alemanha), dissolvido em NaCl 0,9 %

contendo 5 % de monooleato de polioxietilenosorbitol (Tween 80; Vetec, Brazil). A dose foi selecionada com base em trabalhos prévios do nosso laboratório (STERN et al., 2012; GAZARINI et al., 2015).

D-cicloserina (DCS; agonista parcial de receptores glutamatérgicos NMDA; 15 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA) dissolvida em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%). A dose foi selecionada com base em trabalhos prévios do nosso laboratório (GAZARINI et al., 2015) e outros (BUSTOS et al., 2010).

4.4 Cirurgia estereotáxica

1.4.4.1 Cirurgia estereotáxica

Os animais primeiramente receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de uma solução de quetamina (100 mg/ml/kg; Cetamin®, Syntec Ltda., Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg; Xilazin®, Syntec Ltda., Brasil) para anestesia. Após a perda total dos reflexos, o animal foi posicionado no aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA) através de duas barras auriculares e a assepsia do campo cirúrgico foi realizada com uma solução de álcool iodado (2%), com posterior injeção de uma solução anestésica de lidocaína 3% com adrenalina 1:50.000 (Lidostesim®, Dentsply Pharmaceutical, Brasil) por via subcutânea (s.c.) no local da incisão. Um corte longitudinal da pele acima do crânio do animal permitiu a raspagem do periósteo para a exposição do crânio e das suturas lambdóide e coronal. Dois parafusos de aço inoxidável foram fixados ao crânio, após perfuração com uma broca odontológica acoplada à um mini-motor, para suporte da prótese de acrílico a ser utilizada posteriormente.

O atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2009) foi utilizado para a obtenção das coordenadas referentes ao córtex pré-límbico (3,0 mm anterior ao Bregma, \pm 0,6 mm relativo ao eixo lateral e - 1,8 mm relativo ao eixo dorso-ventral). Duas cânulas-guia com tamanho de 11 mm e confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (22G1; 25,0 x 7,0 mm) foram implantadas bilateralmente, para posterior infusão de drogas. Por fim, uma camada de acrílico odontológico auto-polimerizável de secagem rápida foi adicionada ao local para fixar todas as peças em uma prótese sólida presa ao crânio. Em cada uma das cânulas foi inserido um fio de aço inoxidável (nº30) para reduzir a

obstrução. Como tratamento pós-operatório, cada animal recebeu uma injeção (s.c.) de flunixin meglumina (2,5 mg/kg; Schering-Plough, Brasil), um agente analgésico, antipirético e anti-inflamatório.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em ambiente aquecido para evitar hipotermia causada pela anestesia. Em seguida, foram levados ao biotério em caixas-moradia, onde permaneceram entre 7 a 10 dias para recuperação e posterior utilização experimental.

1.4.4.2 Microinjeção central

A microinjeção bilateral no córtex PL foi executada utilizando agulhas com 13,4 mm de comprimento e confeccionadas a partir de agulhas gengivais (30G curta). As agulhas foram conectadas a um tubo de polietileno (PE10; Clay Adams, EUA) acoplado a uma microseringa (Hamilton, EUA), que foi preenchida com água destilada, deixando uma bolha de ar interposta à solução a ser injetada, facilitando a visualização do deslocamento da solução durante a infusão da droga.

No momento da microinjeção, o animal foi imobilizado, o fio de aço retirado com um alicate e a cânula foi desobstruída com uma lima odontológica (K-FILE Colorinox® A012D, Dentsply Ind. Com. Ltda., Brasil) de 11,0 mm. As agulhas foram introduzidas nas cânulas e, com auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), cada animal recebeu 0,2 µl das soluções por hemisfério, infundida durante 60 s. Após a injeção, a agulha foi mantida por 30 s adicionais para reduzir o fluxo retrógrado da solução.

1.4.4.3 Histologia

Ao término dos experimentos, os animais receberam uma solução anestésica contendo cloral hidratado (30% p/v; 3 ml/animal; Vetec, Brasil) sistemicamente (i.p.), seguida pela microinjeção de azul de Evans (0,2 µl/hemisfério). Após decapitação, os encéfalos foram retirados e conservados individualmente em solução de formalina 10% por, pelo menos, 24 h, e posteriormente transferidos para solução de sacarose 30%, no mínimo 48 h antes da realização dos cortes histológicos. Para a verificação do sítio de injeção da droga, cortes coronais (50 µm de espessura) foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Microsystems AG, Alemanha) a uma temperatura

aproximada de -20°C . Os cortes foram fixados em lâminas de vidro para microscopia, gelatinizadas. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa modificado (Sigma Aldrich, EUA), montadas com resina sintética (DPX® ‘mountant for histology’, Sigma Aldrich, EUA) e cobertas com lamínulas.

Imagens representativas foram capturadas com a objetiva de 4x no microscópio óptico (Eclipse 50i; Nikon, EUA) equipado com uma câmera digital. Os cortes foram comparados a diagramas do cérebro de ratos (PAXINOS, WATSON, 2009), e apenas os animais com histologia bilateral para o PL foram incluídos na análise estatística. A figura 6 traz uma imagem representativa do CPFm comparada com o sítio de infusão considerado correto.

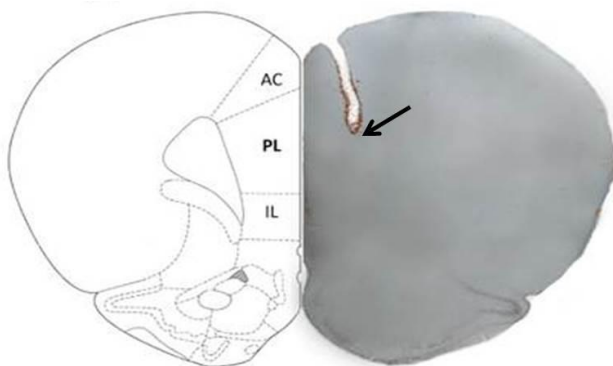


Figura 6. Desenho esquemático de um corte coronal do córtex pré-frontal medial de ratos ilustrando as principais sub-regiões do CPFm: CA, córtex cingulado anterior; PL, córtex pré-límbico e IL, córtex infra-límbico. O sítio de infusão de drogas é indicado pela seta.

4.5 Condicionamento de medo contextual

O condicionamento de medo contextual foi realizado no Contexto A, que consistiu de uma caixa retangular (35 x 20 x 30 cm), com paredes laterais de alumínio, com exceção da parede frontal que foi feita de acrílico, assim como a parede de cima. O piso gradeado, feito de barras de aço inoxidável (3 mm de diâmetro, espaçadas 9 mm cada), foi conectado a um gerador de choques elétricos (Insight, Ribeirão Preto,

Brasil), para a aplicação destes nas patas dos animais (figura 7). Uma segunda caixa (30 x 30 x 30 cm), designada Contexto B, feita de vidro e com uma tampa gradeada e completamente transparente, foi utilizada para verificar a ocorrência de generalização do medo. É importante enfatizar que o contexto B apresenta características neutras, já que apresenta pistas contextuais diferentes do Contexto A e não foi associado aos choques (figura 8b).

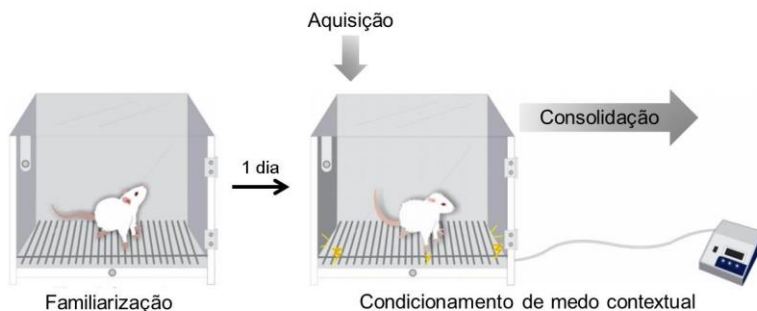


Figura 7. Familiarização ao contexto e associação do contexto (EC) com o estímulo aversivo (EI). A associação entre o estímulo neutro (contexto) com o aversivo (choques) leva à aquisição desse aprendizado, com subsequente consolidação pelas próximas horas (STERN, 2014).

Os experimentos comportamentais foram realizados em condições de baixa luminosidade (70 lux) e ocorreram entre às 13:00 e 17:00 h. Cada animal foi colocado no Contexto A, sendo permitida a livre exploração (3 min), durante uma sessão inicial de familiarização. No dia seguinte, o rato foi colocado novamente no Contexto A para a sessão de condicionamento (ou pareamento), durante a qual ele recebeu, após 30 s iniciais, um choque elétrico nas patas (1 mA, 60 Hz, por 3 s), no protocolo denominado *condicionamento fraco*. O animal permaneceu na caixa por 30 s adicionais (período pós-choque) antes de retornar à caixa-moradia. Em algumas situações, os animais receberam, durante a sessão de condicionamento, não um, mas três choques elétricos nas patas (de mesma intensidade, com intervalo de 30 s entre cada choque), no protocolo denominado *condicionamento forte*.

Uma evidência concreta de que houve a formação da memória aversiva é a observação de alterações comportamentais (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; FANSELOW, 1990). Por isso, um dia após a sessão de condicionamento, os animais são reexpostos no contexto que foi associado com o choque para avaliação e quantificação de comportamentos relacionados ao medo. Ou seja, nessa sessão, a memória associativa que conecta as informações contextuais ao EI é evocada. Dessa forma, é natural esperar a ocorrência de comportamentos de medo no contexto associado com os choques, mas não em um contexto não-associado ou neutro (LEDOUX, 2000), conforme mostra a figura 8. Assim, um dia após a sessão de condicionamento, os animais foram reexpostos ao Contexto A (3 min), sem a apresentação de choques, para a evocação e avaliação da memória (Teste A1) (figura 7). Um dia depois, os animais foram expostos ao Contexto B (3 min), a fim de avaliar a ocorrência de generalização do medo frente à este contexto neutro (Teste B1) (figura 8).

Para manipular a etapa de consolidação da memória, interferências farmacológicas foram realizadas imediatamente após a sessão de condicionamento. Quando o objetivo foi avaliar a etapa de reconsolidação, uma sessão adicional de evocação da memória foi realizada um dia após a sessão de condicionamento, na qual os animais foram reexpostos ao Contexto A (3 min) sem a apresentação de choques. Imediatamente após essa sessão, as interferências farmacológicas foram realizadas. De maneira geral, todas as sessões foram espaçadas entre si por um período de 24 h. Quando apropriado, os animais foram retestados (Teste A2 e Teste B2) 14 dias após o condicionamento. Demais variações de protocolo serão devidamente apontados durante a descrição dos resultados.

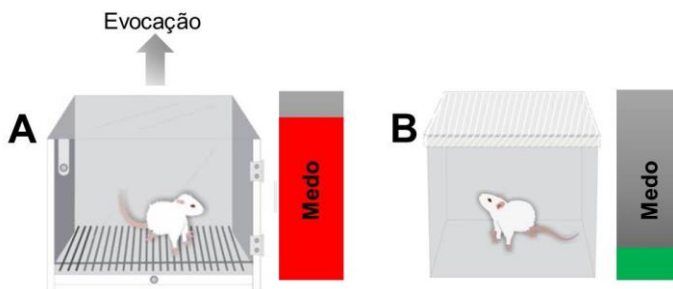


Figura 8. Evocação da memória previamente consolidada. (A) Ao retornar ao contexto previamente pareado com os choques nas patas, a memória aversiva pode ser evocada, levando à expressão de comportamentos de medo. (B) Em um contexto neutro, essa mesma memória não é evocada, e comportamentos de medo não são observados (GAZARINI, 2015).

A generalização do medo pode ser induzida para posterior estudo utilizando também o condicionamento clássico: a exposição de um roedor a um contexto neutro, diferente daquele utilizado anteriormente para a associação com os choques, não deveria desencadear a expressão de comportamentos defensivos de maneira relevante, uma vez que essa pista neutra não foi associada com o estímulo aversivo original (figura 9). A partir daí, manipulações realizadas com o intuito de reforçar o aprendizado e consolidação podem desencadear a ocorrência da generalização, possibilitando estudá-la (BALDI et al., 2004; GAZARINI et al., 2014). Sugere-se que a hiperatividade noradrenérgica e outros hormônios do estresse facilitem a retenção de memórias aversivas; assim, alguns autores sugerem que modelos animais que desencadeiam memórias de medo condicionadas de maneira mais intensa podem ser utilizados para estudar alguns processos clinicamente relevantes em termos de transtornos psiquiátricos (PITMAN, 1989; O'DONNELL et al., 2004; YEHUDA, 2006).

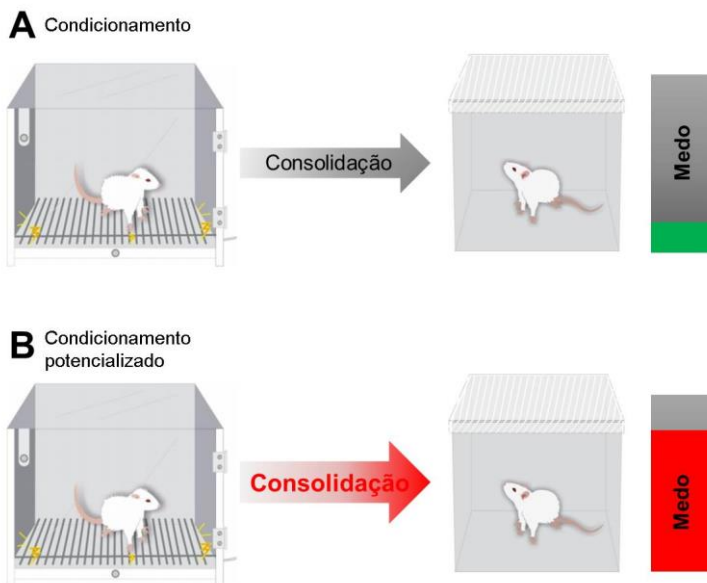


Figura 9. Indução de generalização com base no aprendizado. (A) Um protocolo experimental pode ser padronizado para induzir respostas de medo frente ao contexto pareado mas não no contexto não pareado. (B) Um protocolo mais intenso ou administração de estresse prévio ou drogas que reforcem o aprendizado de medo podem induzir a generalização do medo no contexto não pareado (GAZARINI, 2015).

A sessão de evocação da memória nos permite estudar a reconsolidação ou a extinção: um dia após terem sido submetidos ao protocolo de condicionamento forte, os animais passaram por uma sessão de evocação mais longa (15 minutos), com o objetivo de extinguir a memória aversiva. Quando o objetivo foi interferir com a reconsolidação, o tempo de evocação foi de 3 minutos (figura 10). Ainda com relação ao protocolo de reconsolidação, utilizou-se um período de evocação de 5 minutos, quando necessário. Nos dias seguintes, os Testes A e B foram executados como anteriormente descrito.

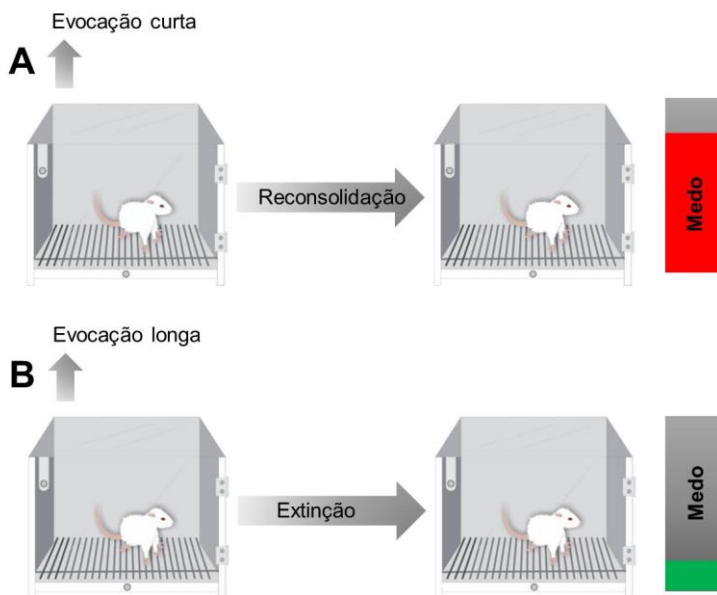


Figura 10. Indução da reconsolidação ou extinção da memória de medo contextual. (A) Exposições curtas (3 min) ao contexto pareado permitem a reativação do traço de memória e subsequente reconsolidação para estabilizar e manter a memória de medo. (B) Exposições mais longas (15 min) levam à extinção, que se sobrepõe à memória original e leva à diminuição das respostas de medo (STERN, 2014; GAZARINI, 2015).

O comportamento de congelamento (do inglês *freezing*), comumente utilizado como índice de medo em ratos (FANSELOW, 1980), é definido como a ausência total de movimentos, exceto os necessários para a respiração. O tempo de congelamento foi quantificado (em segundos) a cada minuto das sessões de evocação e testes e foi expresso como porcentagem de tempo de congelamento total de cada sessão.

Os experimentos foram gravados por uma câmera de vídeo acoplada a um aparelho de DVD, permitindo a avaliação posterior dos comportamentos realizados pelos animais. O experimentador permanecia na antessala, acompanhando o comportamento do animal por meio da visualização pelo monitor. A limpeza de ambos os

contextos foi feita com solução de etanol 10% (v/v) após cada uma das sessões experimentais realizadas.

4.6 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é construído de MDF branco (EP-151, Insight, Brasil) com uma plataforma central e quatro braços, sendo dois abertos (50 x 10 cm) e dois fechados por paredes laterais (50 x 10 x 40 cm), dispostos de maneira oposta. Cada braço aberto é circundado por um anteparo de acrílico (1 cm de altura).

Os animais foram submetidos ao LCE (5 min), sendo colocados na plataforma central e voltados para um dos braços fechados. Os experimentos foram gravados por uma câmera de vídeo acoplada a um aparelho de DVD, permitindo a avaliação posterior dos comportamentos realizados pelo animal. O experimentador permanecia na antessala, acompanhando o comportamento do animal por meio da visualização pelo monitor. A limpeza do LCE foi feita com solução de etanol 10% (v/v).

Os parâmetros comportamentais analisados durante o teste foram: tempo de permanência nos braços abertos (quantificado desde a entrada do roedor em um braço aberto até que uma das patas fosse colocada em outra parte do LCE); entradas nos braços abertos (consideradas apenas quando os animais colocavam as quatro patas em um dos braços abertos); posturas de avaliação de risco (representadas por comportamentos de estiramento, que consiste em colocar pelo menos uma pata em um dos braços abertos e, em seguida, voltar à posição original no centro ou no braço fechado) e número de entradas nos braços fechados (contadas apenas quando os animais colocavam as quatro patas em um dos braços fechados). Com base nesses parâmetros, foram calculadas a porcentagem de tempo nos braços abertos [$(\text{tempo nos braços abertos}/300) \times 100$] e porcentagem de entrada nos braços abertos [$(\text{entradas nos braços abertos}/\text{total de entradas nos braços abertos e fechados}) \times 100$] durante os 5 min de exposição ao LCE.

4.7 Imunohistoquímica

1.4.7.1 Perfusão intracardíaca e preparação do tecido cerebral

Noventa minutos após a sessão de condicionamento de medo contextual forte e infusão bilateral de veículo ou NMDA 100 pmol, os animais receberam uma solução anestésica contendo cloral hidratado 15% p/v (2,3 mg/ml/kg; Vetec, Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg; Xilazin®, Syntec Ltda., Brasil) por via sistêmica (i.p.), seguida da perfusão intracardíaca, inicialmente com solução de sacarose 9,25% (250 ml/rato), seguida de uma solução de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M (pH 7,4; 250 ml/rato), ambas a 4°C. Os encéfalos foram retirados e conservados em solução de paraformaldeído 4% por 24 h, posteriormente transferidos para solução de sacarose 20%, no mínimo 48 h antes da realização dos cortes histológicos. Cortes seriados (5 cópias, 40 µm de espessura) foram obtidos em um criostato (Leica CM 1850, Alemanha) e mantidos em solução anticongelante (propilenoglicol 32,6% e sacarose 18,7% em PBS) para posterior processamento. Adicionalmente, encéfalos foram coletados de um grupo de ratos *naïve*, não submetidos ao protocolo de condicionamento ou infusões intracerebrais, servindo como controle geral do experimento.

1.4.7.2 Reação imunohistoquímica para Arc

As secções foram tratadas com H₂O₂ 1% em metanol (30 min), para redução da atividade da peroxidase endógena. Após lavagens (3 x 5 min) em PBS contendo 0,15% de Triton-X100 (PBS-X), as secções foram incubadas em soro albumina bovina (BSA) 1% em PBS-X (60 min) para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Arc (1:500 em BSA 1%; Santa Cruz Biotechnology, EUA) a 4°C *overnight*. Após a incubação, as secções foram novamente lavadas em PBS-X (3 x 5 min) antes de serem incubadas com o anticorpo secundário biotilado (1:200 em PBS-X; IgG de cabra, anti-coelho; Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 90 min. Após remover o anticorpo secundário, as secções foram lavadas com PBS-X (3 x 5 min) e incubadas com o complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:500 em PBS-X; Vector Laboratories, EUA) por 2 h. A revelação (5~10 min) foi feita utilizando uma solução de tetracloro de 3'3'-diaminobenzidina

(DAB 0,02%, Sigma Aldrich, EUA) contendo 0,03% de sulfato de níquel hexahidratado e cloreto de amônio. Finalmente, as lâminas foram desidratadas com etanol (70, 90 e 100%), diafanizadas com xilol, montadas com resina sintética (DPX® ‘mountant for histology’, Sigma Aldrich, EUA) e cobertas com lamínulas.

1.4.7.3 Regiões de interesse e quantificação de células positivas para Arc

Secções contendo o córtex PL (3,3 – 2,3 mm anterior ao bregma) foram selecionadas utilizando a objetiva de 10x de microscopia óptica (Eclipse 50i; Nikon, EUA) equipado com uma câmera digital, através da qual se obtiveram imagens de 0,21 mm². A delimitação da área para posterior quantificação de células positivas para Arc foi realizada abaixo do sítio de infusão, sendo que apenas células com marcação claramente delimitada foi considerada. Para cada encéfalo, a quantificação foi realizada manualmente, em duplicata, e a média foi calculada. Os resultados foram expressos como o número relativo (em relação ao grupo *naïve*) de células positivas para Arc. Adicionalmente, imagens das secções foram capturadas para fins ilustrativos.

4.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Após verificar a distribuição normal dos dados, estes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias. Quando reexposições ao mesmo contexto foram realizadas, a ANOVA de medidas repetidas foi adotada. Para análise de dois grupos independentes, o teste “t” de Student foi utilizado. Após essas análises, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls foi aplicado quando apropriado, adotando-se um valor de significância estatística de $P < 0,05$. Todos os dados obtidos experimentalmente foram analisados pelo Statistica® 7 (StatSoft Inc., EUA) e representado em gráficos confeccionados através do GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do efeito da microestimulação do córtex pré-límbico na generalização do medo

Considerando que o processamento das diversas etapas de uma memória de medo, bem como sua expressão, requer a atividade do PL, nós nos perguntamos se a potencialização da atividade do PL durante a consolidação de uma memória aversiva seria suficiente para reforçar a consolidação dessa memória, induzindo, em consequência, comportamentos exacerbados de medo como a generalização. Para responder esse questionamento, 35 ratos Wistar machos ($n=7-9/\text{grupo}$) foram submetidos ao condicionamento do medo contextual forte e, imediatamente após, receberam a infusão bilateral de NMDA (30 – 300 pmol/ μl) bilateralmente no córtex PL. Os animais foram testados 1 e 14 dias após o condicionamento. A ANOVA de uma via com medidas repetidas demonstrou, para o Teste A, um efeito para o tratamento ($F_{3,34} = 3,4$; $P = 0,03$) e para a reexposição nas sessões de Teste A1 e A2 ($F_{1,34} = 42,4$; $P = 0,001$), mas não para a interação entre estes fatores ($F_{3,34} = 1,1$; $P = 0,36$). Como mostra a figura 11, embora o Teste A1 não tenha demonstrado quaisquer diferenças entre os grupos, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que a dose de 100 pmol de NMDA gerou um efeito persistente no Teste A2 – realizado 14 dias após o condicionamento – comparado com o respectivo controle. Com relação ao Teste B, a ANOVA de uma via com medidas repetidas apresentou um efeito também para o tratamento ($F_{3,34} = 5,9$; $P = 0,002$) e para a reexposição nas sessões de Teste B1 e B2 ($F_{1,34} = 4,6$; $P = 0,04$), mas não para a interação entre estes fatores ($F_{3,34} = 1,4$; $P = 0,3$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o grupo que recebeu 100 pmol de NMDA apresentou um tempo de congelamento maior no Teste B1, e essa resposta é observada também para o Teste B2 (figura 11). Com base nesses resultados, é possível sugerir que a potencialização da atividade do córtex PL durante a consolidação da memória aversiva aumentou a retenção dessa memória por reforçar processos de consolidação, resultando na ocorrência de generalização do medo.

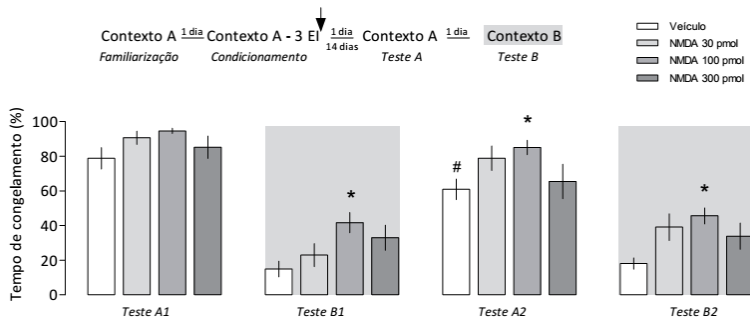


Figura 11. Efeitos da estimulação do córtex pré-límbico durante a consolidação de uma memória de medo contextual forte na indução de generalização. Os testes A1 e B2 foram realizados 1 e 2 dias após o condicionamento, respectivamente. Os testes A2 e B2 foram realizados 14 e 15 dias após o condicionamento, respectivamente. A seta representa o momento da infusão intra-PL. As barras representam a média \pm E.P.M. ANOVA de uma via com repetição seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls (* $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, # $P < 0,05$ em relação ao mesmo grupo no respectivo Teste 1. $n = 7-9$ /grupo). EI: 3 choques de 1 mA, 3 segundos, 30 segundos de intervalo.

5.2 Confirmação do efeito da microestimulação do córtex pré-límbico na facilitação da consolidação da memória de medo contextual

Para confirmar se a indução da generalização ocorreu por uma facilitação da consolidação da memória de medo contextual, potencializando a consolidação da memória de medo, um novo grupo com 19 animais ($n = 9-10$ /grupo) foi submetido ao condicionamento de medo contextual, dessa vez utilizando um condicionamento fraco (1 choque de 1 mA nas patas). Imediatamente após, os animais receberam veículo ou 100 pmol de NMDA bilateralmente no PL. O teste “t” de Student demonstrou um efeito significativo para o Teste A ($F_{1,17} = 4,5$; $P = 0,048$) mas não para o Teste B ($F_{1,17} = 0,2$; $P = 0,7$). Como observado na figura 12, esse protocolo é capaz de gerar níveis baixos de congelamento no grupo veículo durante o Teste A, mas os animais que tiveram o PL estimulado imediatamente após o condicionamento apresentam um tempo de congelamento significativamente maior,

indicando de fato uma facilitação na consolidação dessa memória de medo contextual.

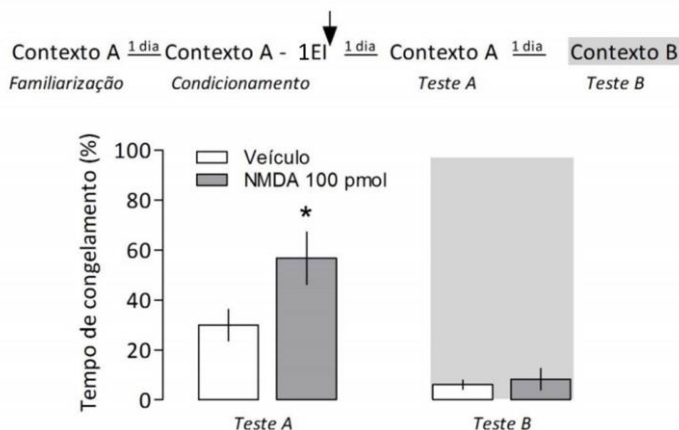


Figura 12. Efeito da microestimulação do córtex pré-límbico após o condicionamento na consolidação de uma memória de medo contextual fraca. A seta representa o momento da infusão intra-PL. As barras representam a média \pm E.P.M. Teste “t” de Student para grupos independentes (* $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, $n=9-10$ /grupo). EI: 1 choque de 1 mA, 3 segundos, 30 segundos de intervalo.

5.3 Avaliação da expressão de Arc no PL após sua microestimulação durante a consolidação da memória de medo

Para avaliar se a facilitação da consolidação da memória de medo contextual estaria envolvida com um aumento de Arc, um marcador relacionado à plasticidade sináptica, no córtex PL, 6 ratos foram alocados em 2 grupos ($n=3$ /grupo) com base na infusão bilateral de veículo ou NMDA 100 pmol no córtex PL. Os animais passaram por perfusão intracardíaca 90 min após o condicionamento de medo contextual forte, que foi seguido pela infusão imediata das soluções no córtex PL. Um grupo náve ($n=3$) não submetido à quaisquer manipulações comportamental ou farmacológica foi incluído na análise.

A ANOVA de uma via indicou um aumento significativo da expressão de Arc em ambos os grupos submetidos ao condicionamento

de medo, quando comparados ao grupo *naïve* ($F_{2,6} = 17,7$; $P = 0,003$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou uma tendência de aumento na expressão de Arc no grupo NMDA comparado com o grupo veículo ($P = 0,07$), como mostra a figura 13.

5.4 Avaliação da duração da generalização do medo com base no protocolo de condicionamento e intensidade da microestimulação do córtex PL

A fim de verificar se a generalização do medo associada à facilitação da consolidação seria duradoura, 23 ratos foram alocados em 2 grupos ($n=11-12/\text{grupo}$), com base na infusão de veículo ou NMDA (100 pmol/lado) no córtex PL realizada logo após a sessão de condicionamento forte, com os testes A e B realizados 28 dias depois. O teste “t” Student demonstrou um efeito significativo para o Teste A ($F_{1,21} = 4,9$; $P = 0,04$) mas não para o teste B ($F_{1,21} = 1,5$; $P = 0,23$), sugerindo que a potencialização do córtex PL durante a consolidação induz a formação de uma memória mais persistente, como demonstra a figura 14.

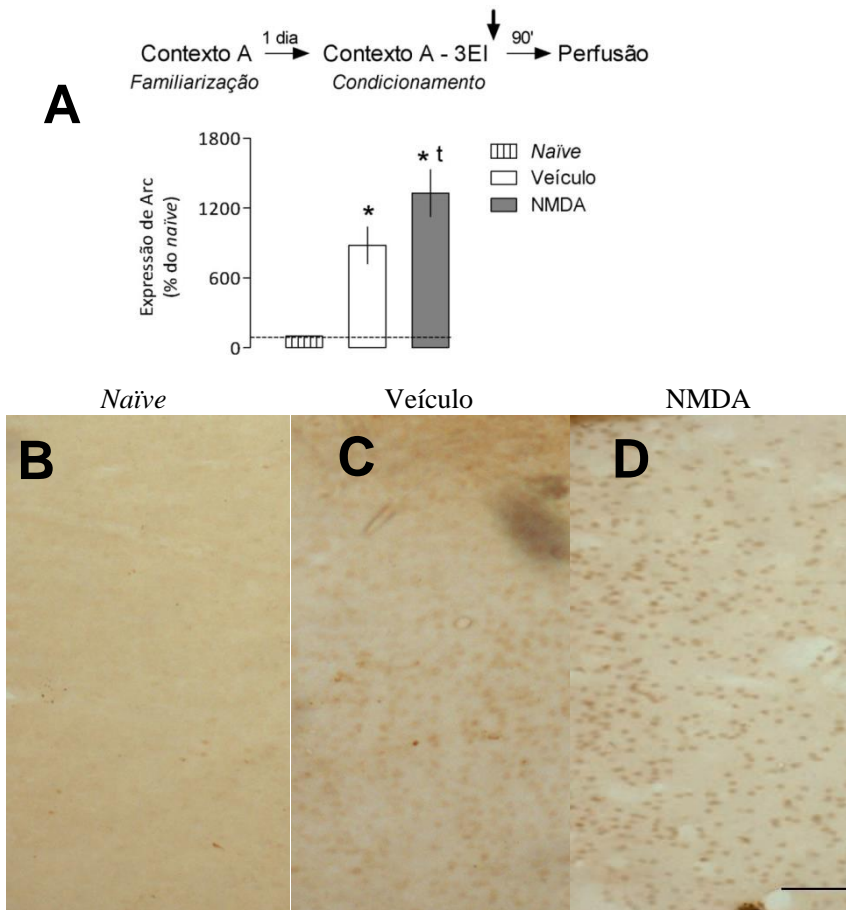


Figura 13. Expressão de Arc no PL em função do condicionamento de medo contextual e da estimulação do córtex PL. Veículo ou NMDA 100 pmol foram infundidos bilateralmente imediatamente após a sessão de condicionamento de medo contextual forte. (A) Expressão de Arc no córtex PL. Acima, o protocolo experimental. A seta indica o momento da infusão das soluções no córtex PL. Abaixo, o gráfico traz os valores expressos como média \pm EPM da porcentagem de aumento na expressão de células positivas para Arc em relação ao grupo *naïve*. Fotomicrografias ilustrativas do córtex PL dos grupos (B) *naïve* e tratados com (C) veículo ou (D) NMDA. Barra: 100 μ m. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo *naïve* e t indica uma tendência à diferença significativa ($t < 0,1$) em relação ao grupo tratado com veículo (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

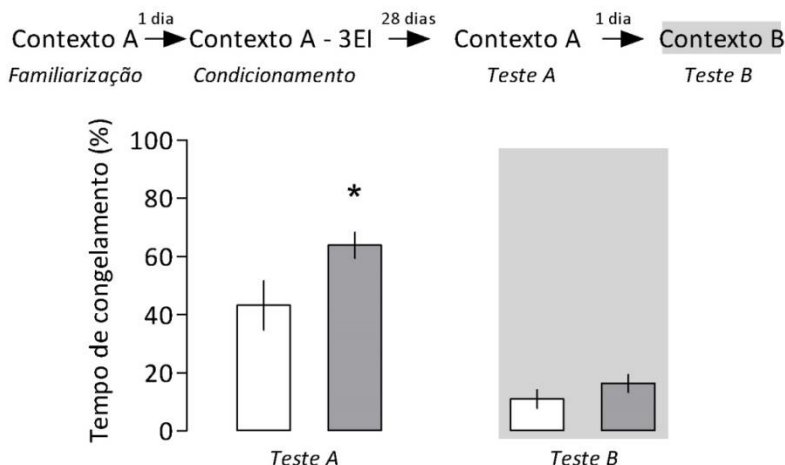


Figura 14. Efeito da microestimulação do córtex pré-límbico a longo prazo. Veículo (VEI) ou NMDA (100 pmol/lado) foram infundidos bilateralmente no córtex PL logo após a sessão de condicionamento forte do condicionamento contextual. O esquema sobre o gráfico representa o procedimento experimental adotado e a seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B) 28 dias após o condicionamento. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste “t” de Student).

Para confirmar que a duração da generalização de medo depende da intensidade do evento aversivo nas nossas condições experimentais, bem como do nível de estimulação realizada no córtex PL durante a consolidação, 16 ratos foram expostos à um condicionamento de medo contextual mais forte (5 choques nas patas associados ao contexto) e foram alocados em 2 grupos ($n=7-9/\text{grupo}$) baseado na infusão no córtex PL de veículo ou de uma dose mais alta de NMDA (300 pmol) dados imediatamente após o condicionamento. Conforme mostra a figura 15, o Teste “t” de Student mostrou um efeito do tratamento ($t_{14} = 2,28$; $P = 0,05$) durante a exposição ao Teste B realizado 28 dias após o condicionamento de medo. Adicionalmente, nenhuma alteração foi observada durante o Teste A ($t_{14} = 1,7$; $P = 0,5$).

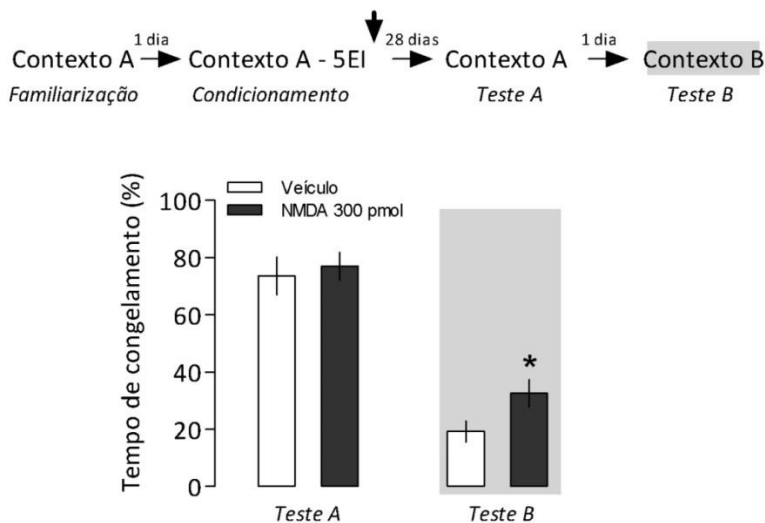


Figura 15. Efeito da intensidade do condicionamento e da microestimulação do córtex pré-límbico a longo prazo. Veículo ou NMDA (300 pmol/lado) foram infundidos bilateralmente no córtex PL logo após a sessão de condicionamento forte do condicionamento contextual. O esquema sobre o gráfico representa o procedimento experimental adotado e a seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B) 28 dias após o condicionamento. * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste “t” de Student).

5.5 Investigação da influência da microestimulação do córtex pré-límbico durante a consolidação da memória de medo contextual no comportamento de esquia avaliado no labirinto em cruz elevado

Para avaliar a ocorrência de sensibilização decorrente do protocolo de generalização do medo, 18 ratos foram alocados em 2 grupos ($n=9$ /grupo) com base na infusão bilateral de veículo ou NMDA (100 pmol/lado) no PL imediatamente após o condicionamento forte. Três dias após o Teste B, os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado para avaliação das respostas defensivas. O teste “t” Student não indicou algum efeito significativo para os parâmetros analisados (%).

tempo nos braços abertos: $t_{16} = 1,9$; $P = 0,3$, % entrada nos braços abertos: $t_{16} = 1,4$; $P = 0,5$; posturas de avaliação de risco: $t_{16} = 1,1$; $P = 0,8$ e entrada nos braços fechados: $t_{16} = 1,7$; $P = 0,3$, indicando a ausência de comportamentos de sensibilização ou alterações locomotoras, conforme mostra a figura 16.

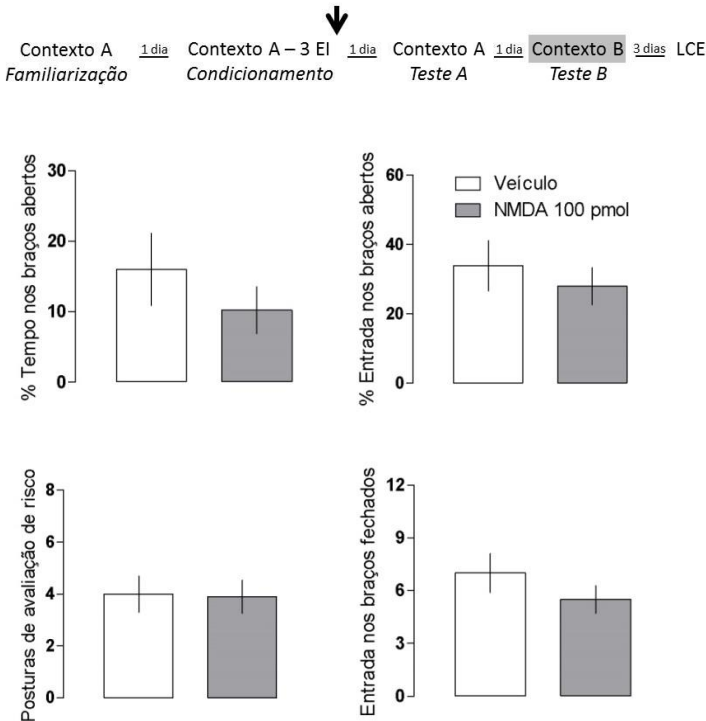


Figura 16. Comportamento avaliado no labirinto em cruz elevado. Três dias após o Teste B, os grupos que receberam veículo ou NMDA 100 pmol imediatamente após o condicionamento de medo contextual forte foram submetidos ao labirinto em cruz elevado. Valores são expressos como média \pm EPM da (A) porcentagem de tempo nos braços abertos, (B) porcentagem de entrada nos braços abertos, (C) número de posturas de avaliação de risco e (D) número de entradas nos braços fechados (teste "t" de Student para grupos independentes).

5.6 Avaliação do papel do córtex pré-límbico na generalização do medo induzida pelo antagonista de receptores α -adrenérgicos ioimbina

No intuito de buscar mais uma evidência de que o córtex PL de fato está envolvido com a generalização do medo, 33 ratos foram alocados em 4 grupos ($n=8-9/\text{grupo}$) com base na infusão central de veículo ou muscimol (MUS; 4 nmol/lado) e no tratamento sistêmico com veículo ou ioimbina (IOI; 2 mg/kg, i.p). O MUS é uma ferramenta bem estabelecida na literatura para induzir a inativação temporária da região cerebral por meio da potencialização da transmissão GABAérgica (SHAH; SJOVOLD; TREIT, 2004, STERN et al., 2014). Já a IOI é uma ferramenta farmacológica estabelecida para a indução do comportamento de generalização em ratos (GAZARINI et al., 2013; GAZARINI et al., 2015). A ANOVA de duas vias, baseada no pré-tratamento e tratamento, não apontou efeito significativo para o Teste A ($F_{1,29} = 0,9$; $P = 0,36$), no entanto, um efeito para o pré-tratamento foi observado no Teste B ($F_{1,29} = 5,9$; $P = 0,02$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls apontou um efeito significativo da ioimbina, induzindo generalização de medo, comparada ao grupo controle; e uma prevenção desse efeito da ioimbina frente à inativação temporária do córtex PL, como mostra a figura 17.

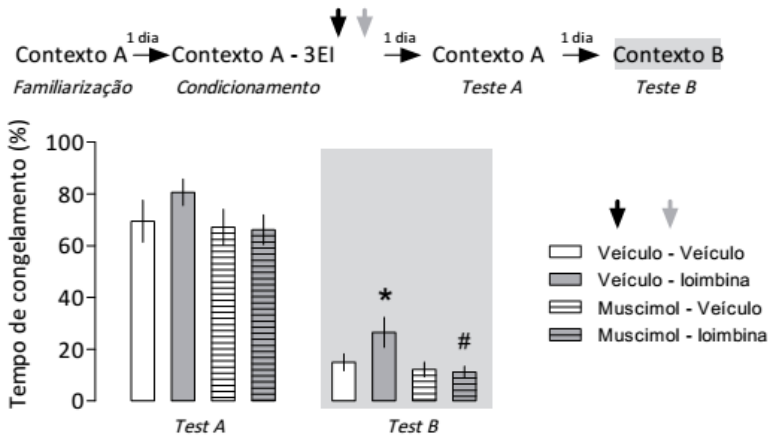


Figura 17. Efeito da inativação temporária do córtex pré-límbico na generalização do medo induzida pelo antagonista de receptores α_2 adrenérgicos ioimbina. Veículo ou muscimol (4 nmol/lado) foram infundidos bilateralmente no córtex PL e, imediatamente após, veículo ou ioimbina (2 mg/kg) foram administrados sistemicamente. Os tratamentos foram realizados logo após a sessão de condicionamento forte do condicionamento de medo contextual. O esquema sobre o gráfico representa o procedimento experimental adotado e a seta indica o momento do tratamento. Valores são expressos como média \pm EPM da porcentagem de congelamento frente ao contexto pareado (Teste A) ou neutro (Teste B). * indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle; # indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo tratado com ioimbina (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

5.7 Investigar o efeito da microestimulação do córtex pré-límbico durante a reconsolidação da memória de medo contextual

Para investigar se a generalização poderia ocorrer também com a microestimulação realizada após a evocação da memória, 16 animais ($n=8$ /grupo) tiveram a memória reativada por 3 minutos um dia após o condicionamento e, imediatamente após, receberam a infusão bilateral de veículo ou NMDA 100 pmol no PL. Embora a ANOVA de uma via com medidas repetidas não tenha demonstrado qualquer efeito significativo para as sessões de reativação, Teste A1 e Teste A2 ($F_{2,28} = 0,2$; $P = 0,8$), esta demonstrou um efeito significativo para os fatores tratamento ($F_{1,14} = 9,6$; $P = 0,01$) e reexposição nas sessões de Teste B1

e B2 ($F_{1,14} = 5,6$; $P = 0,03$). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou a ocorrência de generalização para o grupo cujo córtex PL foi estimulado no Teste B1, e perda do efeito no Teste B2, como mostra a figura 18.

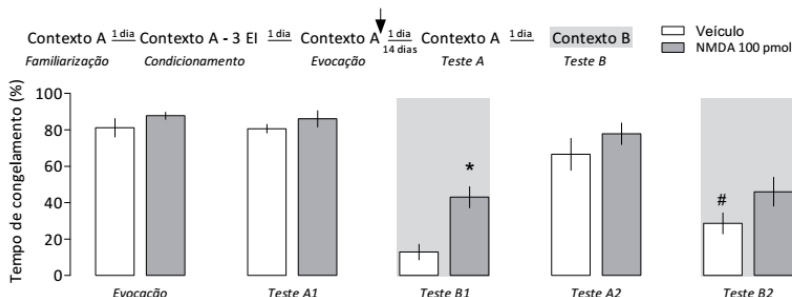


Figura 18. Efeito da microestimulação do córtex pré-límbico na reconsolidação da memória de medo contextual na indução de generalização do medo. Os testes A1 e B1 foram realizados 1 e 2 dias após a evocação, respectivamente. Os testes A2 e B2 foram realizados 14 e 15 dias após a evocação, respectivamente. A seta representa o momento da infusão intra-PL. As barras representam a média \pm E.P.M. ANOVA de duas vias com repetição seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls (* $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, # $P < 0,05$ em relação ao mesmo grupo no teste anterior; $n = 9 \sim 10$ /grupo). EI: 3 choques de 1 mA, 3 segundos, 30 segundos de intervalo (ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

5.8 Investigação da susceptibilidade da memória potencializada à extinção

Para investigar se a memória potencializada é menos susceptível à extinção, 24 ratos foram alocados em 2 grupos ($n = 12$ /grupo) com base na infusão de NMDA 100 pmol ou veículo no córtex PL imediatamente após a sessão de condicionamento de medo contextual forte (3 choques de 1 mA). A sessão de extinção (15 min) foi realizada 1 dia após o condicionamento. A retenção da memória de extinção, bem como seu efeito sobre a generalização de medo, foram avaliados nos dias subsequentes, nas sessões de Teste A e Teste B, respectivamente.

Durante a sessão de extinção, a ANOVA de medidas repetidas indicou um efeito significativo para os fatores tratamento ($F_{1,22} = 11,3$, $P = 0,003$) e tempo da sessão de extinção em blocos de 3 min ($F_{4,88} = 20,6$, $P = 0,0001$), mas não da interação entre esses fatores ($F_{4,88} = 0,84$, $P = 0,5$). Conforme mostra a figura 19, o grupo controle apresentou menos congelamento do segundo ao quinto bloco de extinção, sendo que cada bloco consistiu de 3 min de sessão. O grupo que teve o córtex PL estimulado com 100 pmol de NMDA após o condicionamento apresentou menos congelamento do terceiro ao quinto bloco de extinção. Esse grupo também apresentou mais congelamento que os controles durante os Testes A ($t_{22} = 1,2$; $P = 0,001$) e B ($t_{22} = 3,9$; $P = 0,001$). Adicionalmente, uma diferença significativa se deu no terceiro bloco da extinção: o grupo NMDA apresentou um tempo de congelamento significativamente maior que o grupo veículo ($P < 0,05$). No quarto e no quinto bloco de extinção, uma tendência de aumento no tempo de congelamento é observada no grupo NMDA ($P < 0,1$).

Quando o resultado do Teste A foi comparado com o primeiro bloco de extinção, a ANOVA de medidas repetidas demonstrou um efeito significativo para o tratamento ($F_{1,22} = 9,9$; $P = 0,005$), repetição das sessões ($F_{1,22} = 17,9$; $P = 0,0003$) e interação ($F_{1,22} = 5,9$; $P = 0,02$). O teste *post-hoc* de Newman Keuls revela que um dia após a sessão de extinção, o grupo controle apresenta um tempo de congelamento significativamente menor que o tempo apresentado no primeiro bloco de extinção no contexto pareado, o que não ocorre com o grupo NMDA, sugerindo que a eficiência na retenção da resposta de extinção apresenta-se prejudicada neste último grupo (figura 19).

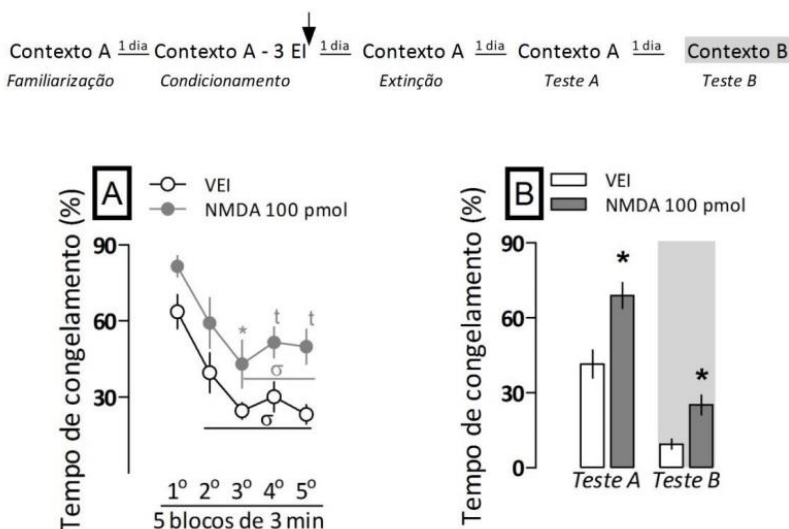


Figura 19. Susceptibilidade da memória potencializada à extinção. Veículo ou NMDA 100 pmol foram infundidos no PL logo após a sessão de condicionamento forte do condicionamento contextual. (A) No dia seguinte, os animais passaram por uma sessão de extinção (15 min) no contexto A, seguido pela (B) avaliação do comportamento frente aos contextos pareados (Teste A) e neutro (Teste B) nos dias subsequentes. A seta representa o momento da infusão intra-PL. Valores são expressos como média \pm E.P.M da porcentagem de congelamento. ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls ou teste “t” de Student para grupos independentes (* $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, ^t $P < 0,1$ em relação ao grupo controle e ^o $P < 0,05$ comparado ao seu primeiro bloco de extinção. $n = 9 \sim 10$ /grupo). EI: 3 choques de 1 mA, 3 segundos, 30 segundos de intervalo.

5.9 Efeito do canabidiol na reconsolidação da memória potencializada

Para investigar se a memória potencializada induzida pela estimulação do córtex PL durante a consolidação apresenta-se resistente aos efeitos amnésicos já conhecidos do CBD (STERN et al., 2012), 34 animais foram distribuídos em 4 grupos ($n = 8-9$ /grupo) com base no tratamento intra-PL realizado imediatamente após a sessão de condicionamento forte com veículo ou NMDA (100 pmol) e o

tratamento sistêmico realizado imediatamente após a sessão de reativação da memória, no dia seguinte, com veículo ou CBD (10 mg/kg).

A ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo do pré-tratamento ($F_{1,30} = 6,1$; $P = 0,02$), tratamento ($F_{1,30} = 5,9$; $P = 0,02$) e reexposições ao Contexto A ($F_{1,30} = 14,2$; $P = 0,001$), além de uma interação entre todos esses fatores ($F_{1,30} = 7,4$; $P = 0,01$).

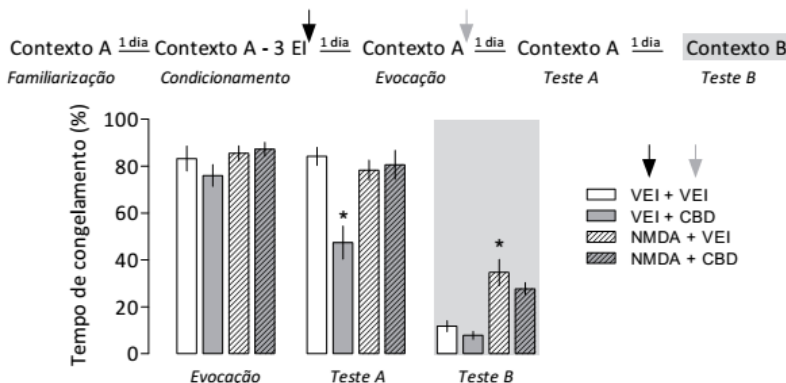


Figura 20. Efeito do canabidiol na reconsolidação da memória potencializada. Veículo (VEI) ou NMDA 100 pmol foram infundidos no PL logo após a sessão de condicionamento. No dia seguinte, imediatamente após a reativação da memória de medo, os animais receberam uma injeção de veículo ou canabidiol (CBD; 10 mg/kg, i.p.). As setas indicam o momento dos tratamentos. As barras representam a média \pm E.P.M. ANOVA de duas vias com ou sem repetição seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls (* $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, $n = 9 \sim 10$ /grupo). EI: 3 choques de 1 mA, 3 segundos, 30 segundos de intervalo.

Embora nenhuma diferença comportamental tenha sido observada entre os grupos durante a sessão de reativação, o tratamento com CBD foi capaz de reduzir o tempo de congelamento no Teste A nos animais pré-tratados com veículo, indicando um prejuízo na reconsolidação dessa memória e confirmando dados prévios do nosso laboratório, conforme demonstrado na figura 20 (STERN et al., 2012). No entanto, esse efeito não foi observado nos animais que foram pré-tratados com NMDA no córtex PL durante a consolidação da memória. No Teste B, a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do pré-tratamento ($F_{1,30} = 41,3$; $P = 0,001$) mas não do tratamento ($F_{1,30} = 2,7$; $P = 0,1$) e interação entre eles ($F_{1,30} = 0,2$; $P = 0,67$), sendo que o

grupo que recebeu a estimulação no córtex PL apresentou um maior tempo de congelamento que o grupo controle, indicando generalização do medo.

5.10 Influência do pré-tratamento com DCS no efeito do CBD na reconsolidação da memória potencializada

A resistência ao efeito amnésico pode indicar que a memória apresenta uma resistência à labilização, sendo que a DCS é uma droga em potencial na facilitação dessa etapa da memória (BUSTOS et al., 2010). Assim, esse experimento teve como objetivo avaliar se a administração prévia de DCS à sessão de evocação seria capaz de resgatar o efeito amnésico do CBD do grupo cujo córtex PL recebeu a estimulação com NMDA 100 pmol. Para isso, 16 ratos foram distribuídos em 2 grupos ($n=7-9/\text{grupo}$), sendo que ambos os grupos receberam a estimulação do córtex PL com NMDA (100 pmol) e foram tratados com CBD (10 mg/kg) após a sessão de evocação, variando-se apenas o pré-tratamento com veículo ou DCS (15 mg/kg) 30 min antes da sessão de evocação.

A ANOVA de medidas repetidas demonstrou um efeito para o tratamento ($F_{1,14} = 16,3$; $P = 0,001$), reexposição ao contexto pareado com as sessões de reativação e Teste A ($F_{1,14} = 15,9$; $P = 0,001$), bem como uma interação entre esses fatores ($F_{1,14} = 6,6$; $P = 0,02$). O teste *post-hoc* de Newman Keuls aponta que durante a sessão de reativação, ambos os grupos apresentam-se iguais em seus níveis de congelamento, no entanto, no Teste A, é possível observar uma redução no comportamento de congelamento no grupo que recebeu o pré-tratamento com DCS comparado com o grupo veículo, sugerindo que o pré-tratamento com DCS resgatou o efeito do CBD em prejudicar a reconsolidação. Adicionalmente, o grupo DCS apresenta diferença significativa quando seu comportamento é comparado entre a reativação e o Teste A ($P < 0,05$). Durante o Teste B, observou-se uma redução da generalização de medo, refletida pela diminuição do tempo de congelamento, no grupo pré-tratado com DCS ($t_{14} = 1,9$; $P = 0,003$), conforme mostra a figura 21.

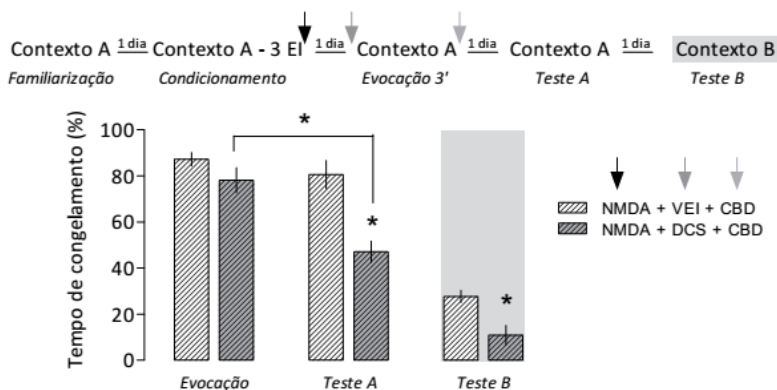


Figura 21. Influência da facilitação da labilização com DCS no efeito do CBD na reconsolidação da memória potencializada. NMDA 100 pmol foi infundido no PL logo após a sessão de condicionamento. No dia seguinte, todos os animais receberam uma injeção de veículo (VEI) ou D-cicloserina (DCS; 15 mg/kg, i.p.) 30 min antes da sessão de reativação. Imediatamente após, os animais receberam uma injeção de veículo ou canabidiol (CBD; 10 mg/kg, i.p.). As setas indicam o momento dos tratamentos. As barras representam a média \pm E.P.M. ANOVA de duas vias com repetição seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls ou Teste T de Student (* $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, $n = 9 \sim 10$ /grupo). EI: 3 choques de 1 mA, 3 segundos, 30 segundos de intervalo.

5.11 Influência do aumento da sessão de evocação no efeito do CBD na reconsolidação da memória potencializada

A literatura demonstra que o aumento do tempo da sessão de evocação é capaz de facilitar a labilização de memórias mais resistentes à esse processo, como é o caso das memórias remotas (BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2009). Sendo assim, esse experimento teve por objetivo investigar se o aumento da sessão de evocação seria capaz de facilitar a labilização da memória potencializada, permitindo o efeito amnésico do CBD na reconsolidação. Para isso, 17 ratos foram alocados em 2 grupos ($n = 7-8$ /grupo), sendo que ambos os grupos receberam a estimulação do córtex PL com NMDA (100 pmol) e passaram por uma sessão de reativação de 5 min. Imediatamente após a sessão de evocação, os animais receberam o tratamento sistêmico de veículo ou CBD (10 mg/kg).

A ANOVA de medidas repetidas demonstrou um efeito para a interação entre os fatores reexposição ao contexto pareado nas sessões de reativação e Teste A e tratamento (Interação: $F_{1,15} = 4,4$; $P = 0,05$; Tratamento: $F_{1,15} = 1,8$; $P = 0,2$; Repetição: $F_{1,15} = 9,6$; $P = 0,007$). Como mostrado na figura 22, o teste *post-hoc* de Newman Keuls apontou que ambos os grupos apresentaram-se iguais em seus tempos de congelamento durante a sessão de evocação, no entanto, durante o Teste A, o grupo que recebeu CBD após a evocação apresentou um tempo de congelamento significativamente menor que o grupo controle. Isso sugere que o aumento da sessão de reativação permitiu que o CBD exercesse seu efeito amnésico durante a reconsolidação da memória. Além disso, o grupo NMDA apresenta diferença significativamente diferente quando seu comportamento é comparado entre a reativação e o Teste A. Adicionalmente, o Teste T Student demonstrou uma tendência de efeito significativo para o tempo de congelamento observado durante o teste B ($t_{15} = 5,7$; $P = 0,07$).

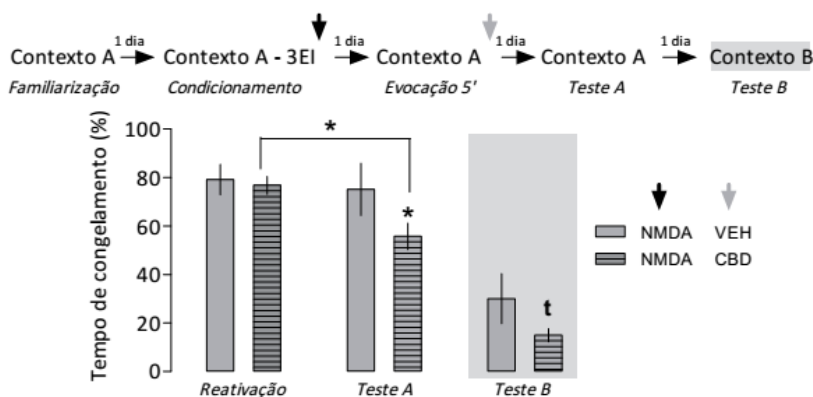


Figura 22. Influência do aumento da sessão de evocação no efeito do CBD na reconsolidação da memória potencializada. NMDA 100 pmol foi infundido no PL logo após a sessão de condicionamento. No dia seguinte, todos os animais passaram por uma sessão de reativação de 5 min e, imediatamente após, receberam uma injeção de veículo (VEI) ou canabidiol (CBD; 10 mg/kg, i.p.). As setas indicam o momento dos tratamentos. As barras representam a média \pm E.P.M. ANOVA de uma via com repetição seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls ou Teste T de Student (* $P < 0,05$ em relação ao grupo controle, $n = 9-10$ /grupo). EI: 3 choques de 1 mA, 3 segundos, 30 segundos de intervalo.

6. DISCUSSÃO

6.1 A indução da generalização pelo reforço de memória induzido pelo aumento da atividade do córtex PL

Estudos recentes vêm demonstrando que um estímulo estressor ou farmacológico administrado antes da consolidação leva a um comportamento exagerado de medo quando os animais estressados se deparam com um estímulo novo, que normalmente induziria respostas mínimas de medo (ADAMEC et al., 2005; BIGNANTE et al., 2008; BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2013; 2014). Alguns destes autores sugerem que, tanto o aumento do medo devido à uma experiência estressora prévia ao aprendizado quanto o aumento da intensidade ou quantidade de choques durante o condicionamento, além da facilitação da consolidação com ferramentas farmacológicas, são fatores críticos para o desenvolvimento de generalização do medo. No presente trabalho, a estimulação dos receptores NMDA do córtex PL potencializou a consolidação da memória de medo contextual, induzindo uma incapacidade na restrição da expressão do comportamento de congelamento ao contexto pareado, corroborando esses trabalhos. Embora ainda não existissem relatos na literatura de que a ativação de receptores NMDA no córtex PL é capaz de reforçar a consolidação de uma memória de medo, alguns estudos já demonstraram o prejuízo de consolidação após o bloqueio desses receptores (TRONEL; SARA, 2003; GILMARTIN; HELMSTETTER, 2010; GILMARTIN et al., 2013).

O papel do CPFm no armazenamento de memórias geralmente era mais associado com as memórias remotas (FRANKLAND et al., 2004). Hoje, se sabe que a consolidação de memórias aversivas também depende da atividade do córtex PL, bem como do córtex CA, provavelmente por conta de suas conexões com regiões cerebrais do circuito do medo. O envolvimento do córtex PL no condicionamento de medo contextual recente se dá, em partes, por sua atividade em conjunto com o hipocampo, que auxilia na representação contextual (HYMAN et al., 2012) e nos mecanismos de LTP necessários para tal (LIM et al., 2010; SAKATA et al., 2013).

O presente estudo corrobora trabalhos recentes que relacionam a atividade do córtex PL com a generalização de respostas de medo (ROZESKE et al., 2014; EINARSSON; PORS; NADER, 2015) e prejuízo de discriminação entre estímulos (KORZUS, 2015; VIEIRA et

al. 2014; VIEIRA et al., 2015). Os resultados do presente estudo também corroboram estudos prévios que relacionam o reforço de consolidação com generalização (BALDI et al., 2004; BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2014), sugerindo que um nível elevado de aprendizado é necessário para a indução dessa característica comportamental (figura 23). Outros trabalhos já demonstraram que a facilitação da consolidação de uma memória de medo por administração sistêmica de corticosterona (KAOUANE et al., 2012) ou ioimbina (GAZARINI et al., 2014) leva à expressão de níveis máximos de congelamento no contexto pareado e generalização de medo no contexto não-pareado. De maneira importante, esse protocolo de condicionamento utilizado no presente estudo não é capaz de induzir a generalização *per se*, como observado com os grupos controles submetidos ao condicionamento forte (GAZARINI et al., 2014).

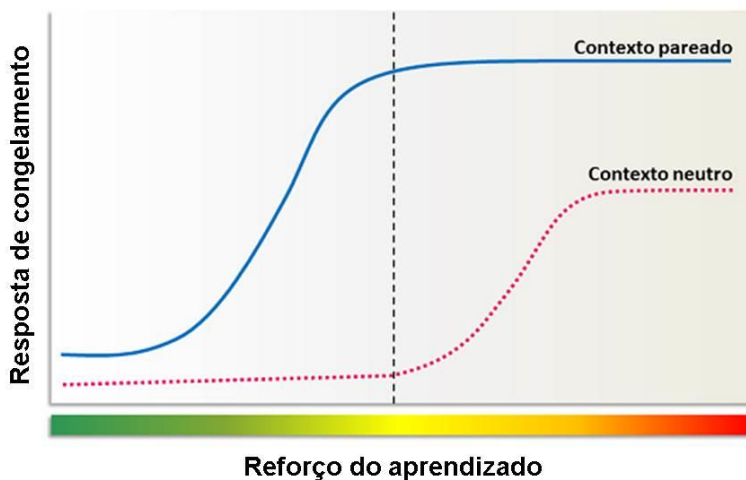


Figura 23. A importância do nível de aprendizado na indução da generalização. Em situações nas quais o aprendizado de medo (refletido em tempo de congelamento) alcança níveis teto frente ao contexto pareado, qualquer reforço adicional nesse aprendizado induz a generalização do medo (GAZARINI, 2015).

Um dia após o condicionamento fraco, o grupo que recebeu a estimulação do córtex PL apresentou um aumento do congelamento

apenas no Teste A. Nesse experimento, um traço de memória passou a ser comportamentalmente detectável através do aumento da atividade do PL durante a consolidação. Esse resultado reforça o papel do córtex PL nessa etapa de memória (CHOI et al., 2012; ZELIKOWSKY et al., 2013; McREYNOLDS et al., 2014).

Nosso laboratório demonstrou em trabalhos anteriores que a ioimbina não atua como um estímulo incondicionado, e sim que seu efeito na indução de generalização do medo necessita do pareamento com os choques nas patas (GAZARINI et al., 2013). Embora esse controle não tenha sido realizado no presente trabalho, pode-se supor com base no experimento 1.5.2 que a estimulação do córtex PL *per se* não leva à generalização do medo, uma vez que esta resposta comportamental não foi induzida quando esse protocolo de condicionamento mais fraco foi realizado.

No presente estudo, nenhuma alteração comportamental foi observada quando os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado, embora a sensibilização do medo seja uma característica observada em protocolos de condicionamento de medo que levam à formação de uma memória traumática mais robusta (ADAMEC, HEBERT, BLUNDELL, 2011; CAMPOS et al., 2013a; 2013b; GAZARINI et al., 2013) bem como em pacientes com PTSD (DYKMAN; ACKERMAN; NEWTON, 1997; ANISMAN, 2011). A ioimbina, na dose utilizada para induzir a generalização do medo, é capaz de induzir também a expressão de comportamentos ansiogênicos quando administrada 30 min antes da exposição dos animais ao LCE (GAZARINI et al., 2013). Embora já se saiba que os receptores NMDA do córtex PL estejam envolvidos com respostas relacionadas à ansiedade (RESSTEL et al., 2006; STERN et al., 2010), no presente estudo a generalização é observada 48 h após a estimulação desses receptores, sugerindo que essa resposta seria principalmente relacionada com a memória aversiva previamente formada ao invés de um estado exagerado de respostas relacionadas à ansiedade. De qualquer maneira, seria importante investigar melhor esse aspecto com base em modificações do protocolo experimental, realizando o LCE dois dias após o condicionamento (no dia que seria realizado o Teste B no protocolo padrão) ao invés de cinco. Essa modificação proporcionaria a obtenção de um resultado mais confiável com relação à indução de sensibilização após a estimulação do córtex PL.

Já foi demonstrado que a generalização do medo tende a ocorrer naturalmente, à medida que a memória aversiva se torna remota, por

conta de um rearranjo do engrama hipocampal para regiões corticais (DUDAI, 2004; KNIERIM; LEE; HARGREAVES, 2006; WILTGEN; SILVA, 2007). Assim, pode-se sugerir que a ocorrência desta característica comportamental um dia após a experiência aversiva poderia engajar substratos neurais diferenciados e relacionados a um processamento inadequado dessa memória de medo (ROZESKE et al., 2015).

Uma possível explicação para a ocorrência da generalização nesse caso seria o recrutamento de neurônios adicionais que não seriam ativados em um aprendizado mais brando, como demonstrado recentemente por Ghosh e Chattarji (2015). Nesse estudo, neurônios da amígdala lateral respondem de maneira específica à pista pareada na ausência de generalização. No entanto, quando o protocolo de condicionamento de medo é mais forte ao ponto de induzir a generalização, observou-se um aumento no número de neurônios que eram ativados frente à pista auditiva não-pareada com os choques. Com base nisso, pode-se sugerir que existe uma alteração quantitativa no processamento da memória que leva à generalização. É possível sugerir também que a estimulação do córtex PL no presente estudo ativa neurônios adicionais que reforçam a consolidação da memória, levando à generalização do medo. Isso necessita ser mais bem investigado, embora a tendência de aumento na expressão de Arc observada no experimento 1.5.3 suporte essa suspeita.

A comunicação do córtex PL com o hipocampo deve ser levada em consideração. Por conta das projeções que recebe do hipocampo, que tem sido amplamente implicado no processamento contextual (HOOVER; VERTES, 2007; HYMAN et al., 2012; ZELIKOWSKY et al., 2014), o córtex PL é capaz de regular a contextualização da experiência emocional. A taxa de disparo de neurônios do CPFm é gerada, em partes, por ondas teta do hipocampo, indicando que a atividade do CPFm é modulada, em partes, pela informação contextual proveniente do hipocampo (SIAPA; LUBENOV; WILSON, 2005). Considerando que o córtex PL, a região CA1 do hipocampo e o núcleo reuniens do tálamo – que faz a comunicação do PL de volta para a CA1 – são parte de um sugerido circuito de generalização do medo, quaisquer alterações celulares ou funcionais nessa circuitaria levariam à expressão de medo generalizado, que envolveria projeções excitatórias do PL para a amígdala basolateral, bem como para a matéria cinzenta periaqueductal, regiões também importantes para a modulação da expressão do medo (ROZESKE et al., 2015).

6.2 Plasticidade sináptica e o reforço do aprendizado

A quantificação de Arc, uma proteína de função estrutural com expressão imediata frente a eventos que levam à plasticidade neuronal (KORB; FINKBEINER, 2011), nos permite estimar a atividade do PL durante a consolidação da memória de medo contextual. Dando suporte à hipótese de reforço de consolidação para indução de generalização, a estimulação do córtex PL durante a consolidação apresentou uma tendência ($P = 0,07$) à efeito significativo com relação ao grupo controle. Esse resultado vai de acordo com relatos da literatura que relacionam o aumento da expressão de Arc no córtex PL concomitantemente à administração de corticosterona, que foi capaz de reforçar a consolidação de uma memória de medo (MCREYNOLDS et al., 2014). A infusão de NMDA no córtex PL potencializou a consolidação possivelmente por meio de uma influência na expressão de proteínas relacionadas à plasticidade sináptica.

A expressão de Arc é crucial para algumas formas de plasticidade sináptica de longa duração. Sua expressão no hipocampo é necessária para a manutenção da LTP e também para a consolidação de uma memória espacial (GUZOWSKI et al., 2000). De maneira interessante, a consolidação de uma memória aversiva parece expressar Arc no córtex CA (HOLLOWAY; MCINTYRE, 2011), que tem um papel funcional muito semelhante ao córtex PL (PETERS; KALIVAS; QUIRK, 2009). Hormônios do estresse, liberados em uma situação aversiva, também influenciam a expressão de Arc no CPFm (MIKKELSEN; LARSEN, 2006), sugerindo que o estresse pode reforçar a consolidação de uma memória de medo por modular a plasticidade sináptica dependente de Arc no CPFm. Um trabalho recente demonstrou que o bloqueio da expressão de Arc no CPFm impediu a consolidação de uma memória de medo (McREYNOLDS et al., 2014). Assim, pode-se sugerir que o aumento da expressão de Arc no córtex PL seria uma evidência de facilitação da consolidação de uma memória de medo, que influencia na ocorrência de generalização.

Diversos outros mecanismos moleculares desencadeados por ativação NMDA no córtex PL estão envolvidos com o reforço da consolidação de memórias de medo. Um deles envolve a proteína quinase M ζ (PKM ζ), que apresenta atividade persistente e é crítica para a manutenção da LTP, bem como para a formação e manutenção de memórias de longa duração (PASTALKOVA et al., 2006; SACKTOR, 2008). Durante a indução de LTP por meio de ativação de receptores

NMDA, moléculas de sinalização como a CaMKII, PI3K, MAPK, PKA e formação de filamentos de actina são estimulados. Todas essas moléculas são necessárias para a síntese de PKM ζ que, ao se ligar na quinase PDK1, sua fosforilação é induzida para sua conversão em uma conformação de alta atividade constitutiva (KELLY; CRARY; SACKTOR, 2007). No hipocampo, um dos mecanismos propostos para a persistência de memórias é pela potencialização da transmissão sináptica pela PKM ζ através da reconfiguração do tráfego de receptores AMPA, para aumentar sua expressão nos terminais pós-sinápticos (SACKTOR, 2011). No córtex PL, o aumento de sua expressão é capaz de aumentar a retenção de uma memória de medo condicionado ao som (XUE et al., 2014).

Estudos demonstram também que a ativação de receptores NMDA leva à ativação da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII). Um trabalho demonstrou que eventos sinápticos necessários para a consolidação e persistência de memórias no córtex PL também dependem da CaMKII tipo α (FRANKLAND et al., 2001). Esse efeito se deve, entre outros fatores, por um importante papel da CaMKII na manutenção da força sináptica (SANHUEZA et al., 2011).

Além destes, é provável que outros mecanismos moleculares sejam recrutados para a generalização do medo. Um trabalho ainda não publicado do nosso grupo (GAZARINI, 2015) mostra que a administração sistêmica de ioimbina na dose que induz generalização aumenta significativamente a expressão de Arc na região CA1 do hipocampo. Nossos dados corroboram esse anterior, sugerindo que talvez exista uma diferença *quantitativa* em termos de recrutamento de mecanismos, comparando uma memória menos robusta com uma memória que induz generalização. É possível especular ainda, com base em outro trabalho ainda não publicado do nosso grupo (PORTES, 2016), uma diferença *qualitativa* de recrutamento desses mecanismos, uma vez que o antagonismo de receptores $\alpha 1$ e β adrenérgicos no PL com doses sub efetivas de antagonistas não interferiu com a memória no contexto A, mas preveniu a generalização do medo induzida por adrenalina. A investigação desses mecanismos de maneira aprofundada propiciaria um maior entendimento acerca da generalização do medo e de estratégias para minimizá-la.

6.3 A característica duradoura das memórias potencializadas

A generalização do medo induzida pela estimulação do córtex PL persistiu por 14 dias. No entanto, com o mesmo protocolo e manipulação farmacológica, a generalização não persistiu por 28 dias. Nosso grupo anteriormente demonstrou que a generalização induzida pela administração sistêmica de ioimbina dura por até um mês (GAZARINI et al., 2014). No presente estudo, apenas a estimulação de uma única região cerebral foi realizada, podendo explicar um resultado menos duradouro. Para investigar melhor esse resultado, a tentativa da associação entre um protocolo de condicionamento de medo mais forte, que fosse capaz de induzir um nível de congelamento mais alto e duradouro, que é necessário para que a generalização ocorra, com uma dose mais alta de NMDA infundida no PL durante a consolidação da memória, foi capaz de induzir a generalização até 28 dias depois. Nesse caso, a memória potencializada foi duradoura e corrobora evidências de que memórias traumáticas apresentam essa característica (PITMAN, 1989; ELZINGA; BREMNER, 2002; ZOLADZ; DIAMOND, 2013; GAZARINI et al., 2014).

Um trabalho avaliou o perfil temporal da expressão de Arc no hipocampo, demonstrando que ocorrem picos de expressão em 30, 60 e 90 minutos após o condicionamento de medo, e esse aumento de Arc diminui ao longo do tempo, alcançando níveis basais 4 horas após o condicionamento (LONERGAN et al., 2010). É possível especular que a plasticidade sináptica induzida no protocolo de 3 choques, associada à infusão de 100 pmol de NMDA, não foi suficiente para manter a generalização por 28 dias. De fato, o evento aversivo, quando reforçado por um condicionamento mais intenso associado à uma dose elevada de NMDA, induz generalização que persiste por 28 dias e talvez, também induza uma plasticidade mais reforçada, mas isso precisa ser mais bem investigado.

Nesse contexto, um marcador a se levar em consideração é o Δ FosB (forma truncada do FosB), um fator de transcrição da família Fos que regula a plasticidade em algumas regiões cerebrais como o CPFm (NESTLER; KELZ; CHEN, 1999). Sua indução é desencadeada por estresse e drogas de abuso (NIKULINA et al., 2008; NESTLER, 2015). Enquanto a indução e degradação da maioria das proteínas da família Fos é bastante rápida, o Δ FosB tem uma meia vida de aproximadamente 8 dias *in vivo*, fazendo-o um candidato ideal para mecanismos de longa duração na expressão gênica (CARLE et al., 2007; ULERY-

REYNOLDS et al., 2009). Foi demonstrado recentemente que o silenciamento de Δ FosB no hipocampo dorsal prejudica uma memória de medo contextual (EAGLE et al., 2015). Durante um novo aprendizado, os neurônios hipocampais que o codificam expressam Δ FosB, que medeia eventos de sinalização que preparam a célula para alterações morfológicas e fisiológicas associadas com a consolidação (GUZMAN-KARLSSON et al., 2014). Sabe-se que a indução de Δ FosB pode levar a alterações permanentes na expressão gênica através de modificações na cromatina. É sugerido que o Δ FosB produz adaptações de longa duração na maquinaria enzimática que controla a acetilação de histonas (NESTLER; BARROT; SELF, 2001). Foi demonstrado que o aumento na expressão de Δ FosB no córtex PL levou à um aumento na vulnerabilidade ao estresse e que esse pode ser um possível mecanismo relacionado à transtornos associados ao estresse (VIALOU et al., 2014). Embora careça de informações, esse pode ser um mecanismo envolvido com consequências comportamentais duradouras no âmbito da generalização do medo que será investigado nos próximos trabalhos do nosso grupo.

6.4 O papel do córtex PL na indução de generalização do medo por ioimbina

Se a atividade do córtex PL é, de fato, necessária para a generalização do medo, se poderia esperar que esta região cerebral fosse recrutada em um protocolo que induz a generalização da memória de medo. Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram o papel da transmissão noradrenérgica na generalização do medo utilizando a ioimbina (GAZARINI et al., 2013; 2014). Essa droga, ao atuar nos receptores α 2-adrenérgicos expressos na pré-sinapse do *locus coeruleus*, aumenta a liberação de noradrenalina no cérebro (ABERCROMBIE; KELLER; ZIGMOND, 1988; CRESPI, 2009), que aumenta a LTP no CPFm (LIM et al., 2010), sugerindo que o CPFm pode ser um alvo pelo qual a ioimbina atua, induzindo a generalização do medo. Quando esse protocolo foi adotado no presente estudo, a inativação temporária do córtex PL com muscimol preveniu a generalização induzida por ioimbina, sugerindo um papel do córtex PL na indução dessa resposta comportamental.

Apesar dos receptores α 2-adrenérgicos estarem expressos principalmente na pós-sinapse de neurônios do CPFm (ARNSTEN;

GOLDMAN-RAKIC, 1985), a ativação de receptores β -adrenérgicos tem sido relacionada com a modulação do comportamento de congelamento e atividade espontânea no PL (MULLER et al., 2008; RODRIGUEZ-ROMAGUERA et al., 2009; ZHOU et al., 2013; FITZGERALD et al., 2015), sugerindo que estes receptores podem ser um alvo em potencial, no qual a transmissão noradrenérgica estimulada pela ioimbina atua. Receptores do tipo $\alpha 1$ -adrenérgicos também estão amplamente expressos no CPFm (RAINBOW, BIEGON, 1983; NICHOLAS, HÖKFELT, PIERIBONE, 1996), e dados não publicados do nosso laboratório apontam que estes receptores presentes no córtex PL de ratos, além dos receptores β -adrenérgicos, também estão envolvidos com a indução da generalização do medo (PORTES, 2016). Deve-se levar em conta que a infusão de muscimol no córtex PL de animais pré-tratados com veículo não prejudicou a consolidação da memória. Esse resultado pode ser explicado por possíveis circuitos alternativos de processamento de memória que poderiam compensar uma alteração transitória da atividade do córtex PL durante a consolidação (FANSELOW, 2010).

6.5 A reconsolidação de memórias aversivas na generalização do medo

Após a observação do reforço da memória por meio da potencialização da atividade do PL durante a consolidação da memória, nos questionamos se essa potencialização teria a mesma resultante se efetuada durante a reconsolidação. Sendo assim, a reexposição dos animais ao contexto pareado por 3 min – sessão de reativação da memória – é suficiente para favorecer a labilização da mesma, recrutando a reconsolidação (BUSTOS et al., 2009; STERN et al., 2012). Pode-se assumir, então, que a interferência farmacológica realizada nessa janela temporal de reconsolidação pode alterar o traço original da memória, como já bem relatado na literatura atual (NADER, 2000; SARA, 2000a). De fato, o reforço de uma memória traumática após sua reativação pode ser associado com o desenvolvimento e manutenção das memórias traumáticas (FUKUSHIMA et al., 2014).

Já é bem sabido, inclusive, que algumas regiões cerebrais que processam a consolidação também modulam a reconsolidação, como a amígdala e o hipocampo (NADER; HARDT, 2009). Recentemente, o papel do córtex PL na reconsolidação da memória de medo contextual

também foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa (STERN et al., 2014; 2015). De maneira importante para o presente estudo, as condições utilizadas neste experimento foram as mesmas já padronizadas e utilizadas nesses trabalhos anteriores do nosso laboratório, além de outros (BUSTOS et al., 2006; GAZARINI et al., 2014; STERN et al., 2014; 2015). Baseado na evidência de que a reativação da memória pode levar ao seu reforço (NADER; SCHAFE; LEDOUX, 2000b; NADER; HARDT, 2009), pode-se sugerir com o resultado 1.5.7 que a atividade do córtex PL é recrutada para reforçar uma memória previamente consolidada para induzir a generalização do medo através de mecanismos de reconsolidação.

A inativação farmacológica do córtex PL antes do teste comportamental prejudica consideravelmente a expressão do medo condicionado a um som (CORCORAN; QUIRK, 2007). Foi demonstrado, também, que a estimulação elétrica do PL aumenta a expressão do medo condicionado (VIDAL-GONZALEZ et al., 2006). Peters e colaboradores (2009) propuseram que a atividade do CA é necessária para a expressão do medo, assim como acontece com o PL, sugerindo que essas duas sub-regiões do CPFm trabalham de maneira semelhante para "ativar do medo". De maneira interessante, um estudo demonstrou que a estimulação direta do CA também leva à formação de memórias de medo contextual e auditiva de longa duração (TANG et al., 2005). Um pouco mais tarde, em 2012, Nader e Einarsson mostraram que o CA também seria recrutado para a reconsolidação de uma memória de medo contextual em ratos. Com a mesma lógica de Peters e colaboradores, nosso laboratório propôs que, além do PL e do CA atuarem no mesmo sentido quando se trata da expressão do medo, essas duas porções do CPFm também exerceriam um papel semelhante no processo de reconsolidação (STERN et al., 2014). Considerando que a reativação tem um papel importante no fortalecimento de memórias (NADER; SCHAFE; LEDOUX, 2000b; NADER; HARDT, 2009), nós somamos à isso que a atividade do PL é importante também no reforço de uma memória previamente consolidada, ao ponto de induzir generalização. Adicionalmente, um trabalho recente também do grupo do pesquisador Karim Nader demonstrou o papel do CA na generalização do medo (EINARSSON et al., 2014) e, novamente, vamos ao encontro da teoria proposta por Peters ao sugerir que a atividade do PL é semelhante também para modular este fenômeno.

Em resumo, o aumento da atividade do córtex PL durante a consolidação e reconsolidação de uma memória de medo contextual foi

capaz de induzir a generalização do medo. Os presentes resultados dão suporte à evidência clínica da hiperatividade da região cerebral homóloga ao PL em humanos com transtornos psiquiátricos envolvendo comportamentos aumentados de medo. Nossos resultados sugerem que a hiperatividade do córtex anterior cingulado dorsal em humanos pode estar envolvida com a generalização do medo apresentada por pacientes com PTSD.

6.6 A resistência à extinção como característica das memórias potencializadas

Os animais que tiveram o PL estimulado durante a consolidação apresentaram uma menor retenção da memória de extinção, comparado com o grupo controle, mantendo a expressão do medo tanto frente ao contexto pareado como no contexto não pareado, indicando generalização, após o processo de extinção, corroborando dados da literatura que demonstram uma resistência de extinção de memórias aversivas potencializadas (GAZARINI et al., 2014). Embora essa abordagem comportamental já seja amplamente utilizada na clínica para o tratamento de alguns transtornos psiquiátricos (DASKALAKIS; YEHUDA; DIAMOND, 2013; FITZGERALD; SEEMANN; MAREN, 2014; HOFMANN; FANG; GUTNER, 2014), a resistência à esse processo apresenta-se como uma forte limitação no caso das memórias traumáticas (MILAD et al., 2009; CAIN, MAYNARD, KEHNE, 2012). Uma explicação para isso pode ser por conta da baixa relevância da memória de extinção (de valência neutra) na tentativa de suprimir a memória aversiva original, que apresenta uma relevância negativa e retenção muito maior (QUIRK; MUELLER, 2008; ORSINI; MAREN, 2012).

Além de ser crucial para a expressão sustentada do medo, o PL também está envolvido na maior resistência à extinção (BURGOS-ROBLES; VIDAL-GONZALEZ; QUIRK, 2009; SIERRA-MERCADO; PADILLA-COREANO; QUIRK, 2011). De fato, em termos de bases neurais, é bem demonstrado, através de estudos em roedores, que a regulação da extinção é especificamente heterogênea, uma vez que depende das sub-regiões do CPFm de maneira diferencial. Lesões específicas no IL prejudicam o aprendizado de extinção (QUIRK et al 2000), indicando a importância do IL no favorecimento desse processo, ao passo que um prejuízo de extinção é observado em função do aumento da atividade do PL (BURGOS-ROBLES; VIDAL-

GONZALEZ; QUIRK, 2009). Em resumo, a extinção necessita de um balanço adequado na atividade do PL e do IL.

Um estudo demonstrou uma resposta sustentada de neurônios do PL que se relaciona à expressão aumentada de medo durante o teste de retenção da memória de extinção (BURGOS-ROBLES; VIDAL-GONZALEZ; QUIRK, 2009). Associado à isso, dados moleculares demonstram um aumento na expressão de c-fos, um marcador de atividade neuronal, no PL em resposta ao aumento da expressão de medo e resistência à extinção em roedores (HERRY; MONS, 2004; KNAPSKA; MAREN, 2009; MUIGG et al., 2008). Nossos resultados complementam o papel do córtex PL no âmbito da extinção, uma vez que a resistência à extinção da memória potencializada se deu em decorrência de sua hiperatividade durante a consolidação. A grande diferença de função entre o PL e o IL nos comportamentos de medo e extinção (QUIRK; MUELLER, 2008) reflete uma especificidade neuronal funcional: enquanto projeções provenientes da amígdala para o PL são ativadas em estados de medo intenso (SOTRES-BAYON et al., 2012), as projeções da amígdala para o IL são recrutadas durante a extinção do medo, da mesma forma que as projeções que retornam destas sub-regiões para a amígdala modulam sua atividade, conforme exemplificado na figura 5 (SENN et al., 2014).

Existem diversos alvos nos quais um agente farmacológico pode facilitar o processo de extinção, como o agonismo parcial de receptores NMDA (WALKER; DAVIS, 2002; DAVIS et al., 2006; SOTRES-BAYON; BUSH; LEDOUX, 2007; FENDT et al., 2008), potencialização da transmissão noradrenérgica (OUYANG; THOMAS, 2005; BERLAU; MCGAUGH, 2006), antagonismo de receptores adrenérgicos do tipo α_2 (CAIN; BLOUIN; BARAD, 2004; MORRIS, BOUTON, 2007) e antagonismo de receptores dopaminérgicos do tipo D2 (PONNUSAMY et al., 2005). De maneira importante, a DCS vem sendo bastante utilizada com o objetivo de facilitar a extinção, tanto em roedores (YAMAMOTO et al., 2008) quanto em humanos (KLUMPERS et al., 2012; SMITS et al., 2013; ROTHBAUM et al., 2014). Sabendo que a extinção não é um apagamento da memória, mas que após determinado período a memória original pode retornar por processos de recuperação espontânea e reinstalação do medo (QUIRK; MUELLER, 2008; MAREN; PHAN; LIBERZON, 2013; BOUTON, 2014), optou-se, no presente trabalho, por dar ênfase em estratégias que focassem no processo de reconsolidação.

6.7 A resistência ao prejuízo de reconsolidação como característica das memórias potencializadas

Os resultados da primeira sessão desse presente trabalho nos levaram a pensar que a potencialização da atividade do PL durante a consolidação gera uma memória demasiadamente intensa ao ponto de ser resistente à reconsolidação. Estudos prévios têm demonstrado em roedores que uma memória traumática ou potencializada são resistentes à interferências na reconsolidação por agentes amnésicos (WANG; DE OLIVEIRA ALVARES; NADER, 2009; BUSTOS et al., 2010, GAZARINI et al., 2014).

Corroborando essas informações, no presente trabalho o CBD exerceu um efeito típico e esperado de prejuízo de reconsolidação de uma memória aversiva nos no grupo controle, mas o mesmo efeito não foi observado com a memória potencializada, inclusive mantendo os altos níveis de generalização do medo. O CBD é um agonista indireto dos receptores canabinóides tipo 1 (CB1) por aumentar os níveis do ligante endógeno anandamida (BISOGNO et al., 2001; LEWEKE et al., 2012). Diversos estudos vêm demonstrando o papel do CBD na atenuação de respostas defensivas condicionadas e não condicionadas (GUIMARÃES et al., 1990; LEMOS; RESSTEL; GUIMARÃES, 2010), bem como na facilitação da extinção de memórias condicionadas ao contexto (BITTENCOURT; PAMPLONA; TAKAHASHI, 2008; DO MONTE et al., 2013). Embora o efeito final da facilitação da extinção bem como do prejuízo de reconsolidação é semelhante em termos de comportamento avaliado – uma vez que o parâmetro indicativo é a redução do tempo de congelamento frente ao contexto pareado – o protocolo de reconsolidação utilizado no presente trabalho foi previamente padronizado e uma possível facilitação da extinção pelo CBD foi excluída por conta da ausência de reinstalação do medo (STERN et al., 2012).

Estudos demonstram a expressão dos receptores CB1 em regiões cerebrais importantes para o processamento de memórias, incluindo o CPFm (HERKENHAM et al., 1990). Dados não publicados do nosso laboratório mostram que o bloqueio dos receptores CB1 presentes no córtex PL com o antagonista AM251 abole o efeito amnésico do CBD na reconsolidação e que o efeito amnésico do CBD na reconsolidação está relacionado com uma diminuição de zif268, um marcador de reconsolidação, no córtex PL (STERN, 2014). Associado à isso, se sabe também que um efeito antiaversivo do CBD também

depende da atividade do córtex PL (LEMONS; RESSEL; GUIMARAES, 2010). Assim, pode-se sugerir que a facilitação da labilização no córtex PL seja crucial para os efeitos amnésicos do CBD.

Uma questão de dose deve ser levantada no presente resultado. O CBD na dose de 10 mg/kg não foi capaz de prejudicar a reconsolidação da memória potencializada, no entanto, essa dose é capaz de prejudicar a reconsolidação do grupo controle. A dose utilizada foi escolhida com base em um trabalho prévio do nosso laboratório que demonstrou o efeito do CBD pela primeira vez na reconsolidação de uma memória de medo contextual (STERN et al., 2012; 2015). Ao contrário da memória formada no grupo controle, a memória potencializada requer manipulações comportamentais ou farmacológicas adicionais – como o aumento do tempo da sessão de evocação ou doses mais altas de CBD – para que também esta seja susceptível ao prejuízo de reconsolidação.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o CBD é capaz de prejudicar uma memória de 7 dias, mas não se sabe se o CBD é capaz de prejudicar a reconsolidação de uma memória mais remota. Nesse contexto, uma memória remota, que também é menos susceptível ao prejuízo de reconsolidação pelo amnésico midazolam na dose usualmente utilizada para prejudicar a reconsolidação (1,5 mg/kg) passa a ser susceptível à esse prejuízo quando a dose de midazolam é aumentada para 3 mg/kg (BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2009). Assim, um possível efeito de uma dose mais alta de CBD em prejudicar a reconsolidação da memória potencializada no presente estudo de fato não pode ser descartado.

Com relação ao prejuízo de reconsolidação de memórias traumáticas em humanos diagnosticados com PTSD, uma droga que vem sendo testada nesse âmbito é o antagonista de receptores β -adrenérgicos propranolol. Foi demonstrado que essa droga é efetiva na redução do medo quando administrada pouco tempo após o trauma. No entanto, em indivíduos diagnosticados com PTSD há mais tempo, o propranolol é menos efetivo em prejudicar a reconsolidação de memórias traumáticas robustas (GIUSTINO; FITZGERALD; MAREN, 2016). Esse prejuízo de reconsolidação observado em humanos também vem sendo relacionado com um reforço de consolidação da memória traumática por alguns autores (PITMAN, DELAHANTY, 2005). Essas evidências reforçam a importância de modelar essas características em laboratório para buscar alternativas que sejam capazes de prejudicá-las.

6.8 A facilitação da labilização de memórias potencializadas como peça chave para o prejuízo de sua reconsolidação

Sabe-se que a labilização induzida pela evocação da memória depende de vários parâmetros. Um deles é a idade da memória, visto que memórias mais antigas são menos susceptíveis à interferentes farmacológicos (MILEKIC; ALBERINI, 2002; SUZUKI et al., 2004; FRANKLAND et al., 2006). Outro parâmetro importante é a duração da sessão de reativação, uma vez que a reativação de uma memória previamente consolidada por um período de tempo dito “ótimo” leva à reconsolidação. É importante ressaltar que uma sessão longa de evocação leva à extinção, no entanto, uma sessão muito curta de evocação pode não ser suficiente para labilizar a memória e induzir a reconsolidação (TRONSON; TAYLOR, 2007). Consequentemente, o comportamento resultante é crucialmente influenciado pela duração da sessão de reativação (EISENBERG et al., 2003; SUZUKI et al., 2004).

Tomando por base a indução da formação de uma memória traumática forte por meio da potencialização da atividade do PL na consolidação, e considerando que as memórias potencializadas são mais resistentes à labilização e, consequentemente, não reconsolidam (BUSTOS et al., 2010, GAZARINI et al., 2014; ORTIZ et al., 2015), resolvemos investigar se a facilitação da labilização dessa memória de medo permitiria o efeito amnésico do CBD na reconsolidação. Sustentando a teoria de resistência à labilização e corroborando alguns relatos da literatura de que a facilitação da labilização resgata o efeito amnésico de drogas na reconsolidação (BUSTOS et al., 2010; GAZARINI et al., 2014), a administração prévia de DCS antes da evocação foi capaz de resgatar o efeito amnésico do CBD no grupo que anteriormente apresentou essa resistência. Nesse caso, o pré-tratamento permitiu não apenas a redução do comportamento de congelamento frente ao contexto pareado, como também no contexto não pareado. De maneira importante, resultados prévios do nosso laboratório demonstraram que a dose utilizada não interfere, *per se*, nas sessões de reativação, Teste A e Teste B, sugerindo uma ausência de facilitação da extinção nesse caso. Além disso, uma possível dependência de estado também pode ser excluída uma vez que os animais são testados nos dias posteriores aos tratamentos (GAZARINI et al., 2014). Uma possível explicação para isso seria que a DCS possa recrutar mecanismos distintos para sua ação na reconsolidação ou extinção, mas isso precisa ser investigado.

Considerando que o tempo de evocação da memória também é um parâmetro crítico na indução da labilização com posterior reconsolidação da memória, resolvemos investigar se o aumento do tempo da sessão de evocação, *per se*, seria capaz de permitir o efeito amnésico do CBD na reconsolidação. O efeito observado nesse experimento foi semelhante ao experimento no qual a DCS facilitou a labilização, resgatando o efeito amnésico do CBD. Bustos e colaboradores (2009) demonstraram que quando o midazolam é administrado após um período muito curto de evocação (1 min), a memória permanece imune ao seu efeito amnésico. Ou seja, a evocação não necessariamente induz a vulnerabilidade à interferentes quando esta ocorre em um período inferior ao necessário, no entanto, quando a sessão de evocação tem sua duração aumentada para 3 ou 5 minutos, a memória se torna gradualmente vulnerável ao prejuízo de reconsolidação pelo midazolam (BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2009). Lee e colaboradores (2008) também relataram que uma sessão de evocação muito curta é incapaz de induzir a degradação proteica necessária para desestabilizar a memória de medo previamente consolidada.

Alguns mecanismos moleculares relacionados à resistência de labilização de memórias traumáticas já foram relatados. Wang e colegas (2009) observaram um mecanismo molecular que possivelmente medeia condições limitantes para que uma memória seja reconsolidada. A inibição de subunidades NR2B do receptor NMDA antes da reativação da memória tornou-a insensível ao prejuízo de reconsolidação por anisomicina. Esse trabalho sugere que um protocolo de condicionamento mais forte impede o prejuízo de reconsolidação por agentes amnésicos por conta de uma diminuição da expressão de mecanismos necessários para a indução da reconsolidação.

A degradação proteica também é crítica para a manutenção das memórias de longa duração (LOPEZ-SALON et al., 2001; KANDEL, 2001; STEWARD; SCHUMAN, 2001). O principal mecanismo celular que controla a função proteica é o sistema ubiquitina-proteassoma, que consiste de proteínas poli-ubiquitinadas que são degradadas por um complexo de proteassoma (EHLERS, 2003; CIECHANOVER, 2005). Uma vez que a reativação desencadeia nova onda de síntese proteica para remodelar a memória previamente consolidada, a degradação proteica por meio do sistema ubiquitina-proteassoma se torna necessária para o remodelamento das sinapses, consistindo de remoção de algumas proteínas e inserção de outras (EHLERS, 2003). Esses mecanismos são

pouco conhecidos, mas já foi demonstrado que a degradação de proteínas sinápticas no hipocampo e na amígdala modula a desestabilização da memória de medo. Jarome e colaboradores (2011) demonstraram que o ifenprodil, um antagonista seletivo para a subunidade NR2B do receptor NMDA, reduziu a poliubiquitinação na amígdala (um processo necessário para a degradação proteica), sugerindo a dependência da ativação de receptores NMDA nesse processo. No hipocampo, a inibição de proteassoma também impede o prejuízo de reconsolidação induzido pelo inibidor de síntese proteica anisomicina (LEE et al., 2008). Ou seja, parece existir uma forte relação entre a diminuição da subunidade NR2B dos receptores NMDA nas memórias potencializadas, com consequente prejuízo de degradação de proteínas necessárias para desestabilizar essa memória. Um importante trabalho na área demonstrou que a reorganização da memória no hipocampo, após a evocação, depende de degradação de proteínas especificamente pós-sinápticas em sinapses pré-existentes, reconstruindo a memória anteriormente consolidada em conjunto com a nova informação (LEE et al., 2008). Seria interessante investigar os tipos de proteínas e em quais regiões cerebrais do circuito de medo elas são proeminentes, de forma a otimizar o processo de indução de labilização em memórias potencializadas e resistentes à esse processo.

7. CONCLUSÕES

- A microestimulação do córtex PL logo após o condicionamento induziu a generalização de medo;
- A generalização do medo se dá, principalmente, pelo reforço da consolidação da memória aversiva;
- A expressão de Arc no córtex PL é aumentada pelo condicionamento de medo contextual, sendo que foi observada uma tendência de aumento adicional no grupo que teve o córtex PL estimulado;
- A microestimulação do córtex PL levou à formação de uma memória generalizada duradoura;
- A microestimulação do córtex PL não interferiu com comportamentos de esquiva e locomoção avaliados no LCE, embora esse resultado precise ser confirmado;
- A inativação temporária do córtex PL durante a consolidação preveniu a generalização do medo induzida pela ioimbina;
- A microestimulação do córtex PL após a evocação da memória também foi capaz de induzir a generalização por meio da facilitação da reconsolidação da memória de medo contextual;
- O aumento da atividade do córtex pré-límbico durante a consolidação da memória de medo contextual foi capaz de induzir a formação de uma memória menos propensa à extinção;
- O CBD foi capaz de prejudicar a reconsolidação de uma memória de medo contextual, no entanto, a memória potencializada foi resistente ao efeito do CBD;
- O tratamento com DCS 30 min antes da sessão de evocação resgatou o efeito amnésico do CBD na reconsolidação da memória potencializada;

- O aumento do tempo da sessão de reativação mimetizou o efeito da DCS, resgatando o efeito amnésico do CBD na reconsolidação da memória potencializada.

8. PERSPECTIVAS E POSSÍVEIS LIMITAÇÕES DESTE ESTUDO

Apesar dos resultados do presente estudo sugerirem que ocorre um reforço na consolidação da memória aversiva pela infusão de NMDA no PL, alguns experimentos controles ajudariam a confirmar essa hipótese. Um exemplo é o experimento de choque imediato, no qual o animal não tem tempo suficiente para codificar as informações contextuais e, dessa forma, o aprendizado associativo não ocorre. Assim, esse experimento ajudaria a confirmar a hipótese de reforço de consolidação se o NMDA, injetado no PL imediatamente após esse protocolo, não desencadeasse respostas de medo quando reexposto no contexto A. Outra opção seria realizar a infusão de NMDA fora da janela de consolidação (6 horas após o condicionamento).

Como já mencionado, o experimento que visou avaliar respostas de esquiva no LCE não retrata de maneira ideal o seu objetivo, uma vez que esse teste foi realizado 5 dias após o condicionamento. O ideal seria repetir esse experimento realizando o LCE dois dias após o condicionamento com grupos independentes, no dia em que seria realizado o Teste B.

Na segunda etapa, optamos por focar em experimentos que manipulavam a reconsolidação. No entanto, estratégias farmacológicas de facilitação de extinção também poderiam ser testadas nesse caso, com o mesmo objetivo de minimizar o impacto negativo da memória potencializada. Outra alternativa seria realizar uma avaliação temporal da extinção: quanto tempo de reexposição o grupo NMDA precisaria para extinguir e reter a memória de extinção em níveis semelhantes aos do grupo controle.

Por fim, quanto ao prejuízo de reconsolidação, testes de recuperação espontânea ou reinstalação de medo, se realizados, ajudariam a subsidiar os resultados e confirmar o prejuízo de reconsolidação, uma vez que, nesses casos, a memória de medo não retorna.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O medo faz com que os indivíduos executem respostas defensivas adaptativas frente à situações de risco. No entanto, respostas exacerbadas de medo podem se tornar inadequadas ou mal adaptativas, podendo levar à ocorrência de alguns transtornos psiquiátricos (LEDOUX, 2000). Assim, um entendimento profundo sobre mecanismos neurobiológicos das memórias de medo tem implicações clínicas importantes.

É crescente o interesse pelo entendimento acerca do papel das sub-regiões do CPFm no processamento das memórias de medo. O CPFm atua como um sítio que integra projeções de várias estruturas cerebrais e, por isso, é responsável por executar diversas funções. Dentro do CPFm, o PL é recrutado para a expressão de respostas condicionadas. O PL modula não só a expressão do medo aprendido, como também o armazenamento e manutenção de uma memória de medo, recrutando mecanismos moleculares específicos (CHOI et al, 2010; XUE et al., 2015).

A figura 24 traz uma síntese dos resultados obtidos no presente estudo com base em um circuito neuronal proposto por Rozeske e colaboradores (2015) para a generalização do medo. A expressão da generalização envolve projeções diretas do PL para a amígdala e para a PAG. Considerando também o papel do hipocampo no processamento das representações contextuais, e do núcleo reuniens na comunicação entre o córtex PL e o hipocampo, permanece a ser mais bem delineada de qual maneira essa circuitaria é influenciada, em termos moleculares, na geração das memórias potencializadas.

Considerando os resultados demonstrados no presente estudo associados à evidências que (i) o PL está envolvido na consolidação (ZELIKOWSKY et al., 2013), expressão (VIDAL-GONZALEZ et al., 2013) e reconsolidação (STERN et al., 2014) de uma memória de medo contextual; (ii) o aumento da intensidade do evento aversivo está diretamente relacionado com a ocorrência da generalização do medo (BALDI et al., 2004); (iii) respostas de medo exacerbadas, como a generalização, estão diretamente relacionadas com a hiperatividade da região homóloga ao PL em humanos (ROUGEMONT-BÜCKING et al., 2011); podemos sugerir que o PL é uma região cerebral crucial na regulação da generalização do medo. Além disso, dois trabalhos recentes trazem o envolvimento do córtex CA na generalização (EINARSSON et al., 2014; CULLEN et al., 2015). Considerando

também as conexões entre CA e PL (VERTES et al., 2004) e a semelhança de funções entre essas duas sub-regiões em diversas etapas do processamento de memórias (PETERS; KALIVAS; QUIRK, 2009; STERN et al., 2014), nossos resultados corroboram essas evidências, que também nos instigam a aprofundar o estudo acerca do papel do PL na generalização do medo.

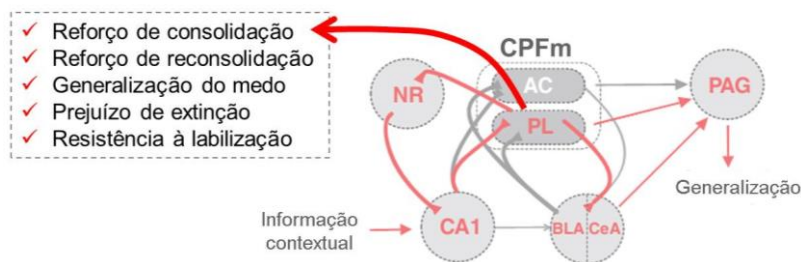


Figura 24. Sugestão de um circuito neuronal de generalização do medo. A discriminação de medo contextual depende do funcionamento de um circuito que compreende a porção CA1 do hipocampo, o núcleo reuniens e o córtex PL. Alterações nessa circuitaria levaria à generalização do medo frente a contextos não pareados. A expressão da generalização compreende projeções diretas do PL para a PAG, ou indiretas através da amígdala. As setas vermelhas indicam as projeções proeminentes durante a generalização do medo. CPFm: córtex pré-frontal medial; AC: córtex cingulado anterior; PL: córtex pré-límbico; NR: núcleo reuniens; CA1: subregião CA1 do hipocampo; BLA: amígdala basolateral; CeA: amígdala central; PAG: matéria cinzenta periaquedutal. A seta vermelha mais proeminente indica as respostas comportamentais observadas frente ao aumento da atividade do córtex PL (ROZESKE et al., 2014).

Adicionalmente, a facilitação da labilização de uma memória traumática associada com a administração de agentes amnésicos torna-se uma abordagem promissora no que compete aos processos de atualização de memórias. No presente estudo, a utilização dessa estratégia permitiu atenuar as características exacerbadas da memória potencializada pelo aumento da atividade do córtex PL durante a consolidação. Porém, muito estudo ainda é necessário nesse campo para aprofundar o entendimento acerca do papel do córtex PL tanto na

generalização do medo, quanto na labilização de memórias potencializadas.

Além disso, também é interessante examinar melhor as vias neuronais responsáveis pela expressão do medo condicionado e oferecer um maior entendimento dos seus alvos, como a amígdala central e a PAG, que também são responsáveis por modular a expressão do comportamento. A região CA1 do hipocampo também carece de mais estudos nesse âmbito: de que maneira essa região hipocampal contribui para a expressão do medo contextual, identificando possíveis alterações nesse processamento quando ocorre a generalização. A busca por mecanismos recrutados na generalização do medo, que não necessariamente são recrutados no processamento de memórias mais brandas, é uma abordagem promissora no que compete à busca por minimizar as consequências comportamentais das memórias traumáticas.

10. REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE ED, KELLER RW JR, ZIGMOND MJ. 1988. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. *Neuroscience* 27:897-904.
- ABRAHAM WC, WILLIAMS JM. 2008. LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. *Neurobiol Learn Mem.* 89 (3): 260-8.
- ALBERINI CM, LEDOUX JE. 2013. Memory reconsolidation. *Curr Biol.* Sep 9;23(17):R746-50. 13.
- ALBERINI CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci.* Jan 28 (1): 51-6.
- ALBERINI CM. 2011. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Front Behav. Neurosci.* 5, 12.
- ANDERO R, RESSLER KJ. 2012. Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes Brain Behaviour.* 11 (5): 503-12.
- ASEDE D, BOSCH D, LÜTHI A, FERRAGUTI F, EHRlich I. 2015. Sensory inputs to intercalated cells provide fear-learning modulated inhibition to the basolateral amygdala. *Neuron.* 22;86 (2): 541-54.
- BALDI, E., LORENZINI, C.A. & BUCHERELLI, C. 2004. Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 81, 162–166.
- BEN MAMOU C, GAMACHE K, NADER K. 2006. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci.* 9(10):1237-9. Epub 2006 Sep 24.
- BERGADO-ACOSTA, J. R.; SANGHA, S.; NARAYANAN, R.T., OBATA, K.; PAPE, H.; STORK, O. 2008. Critical role of the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase in consolidation and generalization of Pavlovian fear memory. *Learning and Memory*, v. 15, p. 163-171.
- BERGINK, V.; MEGEN, H.J.; WESTENBERG, H.G. 2004. Glutamate and anxiety. *European Neuropsychopharmacology*, 14(3): 175-183.
- BERLAU DJ, MCGAUGH JL. 2006. Enhancement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and

- GABAergic systems within the basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem* 86:123–132.
- BERNECKER S. Memory. Oxford: *Oxford Univ Press*; 2010.
- BITTENCOURT RM, PAMPLONA FA, TAKAHASHI RN. 2008. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 18: 849-59.
- BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ. 1988. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol*. 39:43-68.
- BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC. 1969. Crouching as an index of fear. *J Comp Physio Psych*, 67, pp. 370–375
- BLANCHARD RJ, YANG M, LI CI, GERVACIO A, BLANCHARD DC. 2001. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neurosci Biobehav Rev* 25(7-8):587-595
- BLISS TV, COLLINGRIDGE GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. Jan 7;361:31-9.
- BLISS TV, LØMO T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973 Jul; 232: 331–356.
- BONNE O, GRILLON C, VYTHILINGAM M, NEUMEISTER A, CHARNEY DS. 2004. Adaptive and maladaptive psychobiological responses to severe psychological stress: implications for the discovery of novel pharmacotherapy. *Neurosci Biobehav Rev*. 28(1):65-94.
- BONTEMPI B, LAURENT-DEMIR C, DESTRADE C, JAFFARD R. 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature*. 400: 671–675.
- BOUTON ME. 2014. Why behavior change is difficult to sustain. *Prev Med* 68:29-36.
- BREMNER JD, VERMETTEN E, SCHMAHL C, VACCARINO V, VYTHILINGAM M, AFZAL N, GRILLON C, CHARNEY DS. 2005. Positron emission tomographic imaging of neural correlates of a fear acquisition and extinction paradigm in women with childhood sexual-abuse-related post-traumatic stress disorder. *Psychological Medicine*, 35(6), 791–806
- BURGOS-ROBLES A, VIDAL-GONZALEZ I, QUIRK GJ. 2009. Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons

- are correlated with fear expression and extinction failure. *J. Neurosci.* 29, 8474–8482.
- BURKE A, HEUER F, REISBERG D. 1992. Remembering emotional events. *Memory & Cognition*, v. 20, n. 3, p. 277-290.
- BUSTOS SG, GIACHERO M, MALDONADO H, MOLINA VA. 2010. Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. *Neuropsychopharmacology*. 35:1097-108.
- BUSTOS SG, MALDONADO H, MOLINA VA. 2006. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neurosci.* 139:831-42.
- BUSTOS SG, MALDONADO H, MOLINA VA. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34: 446-457.
- CAIN CK, BLOUIN AM, BARAD M. 2004. Adrenergic transmission facilitates extinction of conditional fear in mice. *Learn Mem* 11:179–187.
- CAIN CK, MAYNARD GD, KEHNE JH. 2012. Targeting memory processes with drugs to prevent or cure PTSD. *Expert Opin Investig Drugs* 21:1323-1350.
- CARLE TL, OHNISHI YN, OHNISHI YH, ALIBHAI IN, WILKINSON MB, KUMAR A, NESTLER EJ. 2007. Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: identification of FosB degron domains and implications for DeltaFosB stability. *Eur J Neurosci* 25:3009–3019.
- CAVALLI J, BERTOGLIO LJ, CAROBREZ AP. 2009. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 92:512-518.
- CHOI DC, GOURLEY SL, RESSLER KJ. 2012. Prelimbic BDNF and TrkB signaling regulates consolidation of both appetitive and aversive emotional learning. *Transl Psychiatry*. 2: e205.
- CHOI DC, MAGUSCHAK KA, YE K, JANG SW, MYERS KM, RESSLER KJ. 2010. Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 9;107:2675-80.
- CIECHANOVER A. 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(1):79-87.

- COHEN H, ZOHAR J, MATAR MA, ZEEV K, LOEWENTHAL U, RICHTER-LEVIN G. 2004. Setting apart the affected: the use of behavioral criteria in animal models of posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*. 29(11):1962-70.
- CORCORAN KA, QUIRK GJ. 2007. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci*. 2007;27:840–844.
- COSTANZI M, SARAULLI D, CANNAS S, D'ALESSANDRO F, FLORENZANO F, ROSSI-ARNAUD C, CESTARI V. 2014. Fear but not fright: re-evaluating traumatic experience attenuates anxiety-like behaviors after fear conditioning. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 8:279.
- CRESPI F. 2009. Anxiolytics antagonize yohimbine-induced central noradrenergic activity: a concomitant in vivo voltammetry-electrophysiology model of anxiety. *J Neurosci Methods* 180:97-105.
- DASKALAKIS NP, YEHUDA R, DIAMOND DM. 2013. Animal models in translational studies of PTSD. *Psychoneuroendocrinology*. 38(9):1895-911.
- DAVIS M, RESSLER K, ROTHBAUM BO, RICHARDSON R. 2006. Effects of D-cycloserine on extinction: translation from preclinical to clinical work. *Biol Psychiatry* 60:369–375.
- DE OLIVEIRA ALVARES L, CRESTANI AP, CASSINI LF, HAUBRICH J, SANTANA F, QUILLFELDT JÁ. 2013. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neurosci* 244, 42–48
- DEACON BJ, ABRAMOWITZ JS. 2004. Cognitive and behavioral treatments for anxiety disorders: a review of meta-analytic findings. *Journal of Clinical Psychology*. 60(4):429-41.
- DESMEDT A, MARIGHETTO A, PIAZZA PV. 2015. Abnormal Fear Memory as a Model for Posttraumatic Stress Disorder. *Biol Psychiatry*. 1;78(5):290-7.
- DEVIETTI TL, HOLLIDAY JH, LARSON RC. 1973. Comparison of amnesias induced by electroconvulsive shock administered after training-trial footshock or noncontingent footshock in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol*. 84, 579–585
- DO MONTE FH, SOUZA RR, BITENCOURT RM, KROON JA, TAKAHASHI RN. 2013. Infusion of cannabidiol into

- infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors. *Behav Brain Res.* 250:23-7.
- DOLAN RJ. 2002. Emotion, Cognition, and Behavior. *Science* 298: 1191-1194
- DUDAI Y, EISENBERG M. 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44, 93–100.
- DUDAI Y. 2002. *Memory from A to Z: keywords, concepts, and beyond*. Oxford University Press.
- DUDAI Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55, 51–8610.
- DUDAI Y. 2006. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 174–178.
- DUNCAN CP. 1949. The retroactive effect of electroshock on learning. *J Comp Physiol Psychol.* 42(1):32-44.
- DUNSMOOR JE, MITROFF SR, LABAR KS. 2009. Generalization of conditioned fear along a dimension of increasing fear intensity. *Learning and Memory*, v. 16, n. 7, p. 460-469.
- EAGLE AL, GAJEWSKI PA, YANG M, KECHNER ME, AL MASRAF BS, KENNEDY PJ, WANG H, MAZEI-ROBISON MS, ROBISON AJ. 2015. Experience-Dependent Induction of Hippocampal Δ FosB Controls Learning. *J Neurosci.* 7;35(40):13773-83.
- EHLERS A, HACKMANN A, MICHAEL T. 2004. Intrusive re-experiencing in post-traumatic stress disorder: phenomenology, theory, and therapy. *Memory* 12:403-415.
- EHLERS MD. 2003. Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci.* 6(3):231-42.
- EINARSSON EÖ, NADER K. 2012. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem.* 19:449-52.
- EINARSSON EÖ, PORS J, NADER K. 2015. Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. *Neuropsychopharmacology.* Jan;40:480-7.
- EISENBERG M, KOBILO T, BERMAN DE, DUDAI Y. 2003. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* 301: 1102–1104.

- EUSTON DR, GRUBER AJ, MCNAUGHTON BL. 2012. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*. 20;76(6):1057-70.
- FANSELOW MS. 1982. The post-shock activity burst. *Anim. Learn. Behav.*, 10, pp. 448–454
- FANSELOW MS. 1990. Factors governing one-trial contextual conditioning. *Anim Learn Behav*. 18:264–270.
- FANSELOW MS. 2000. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110(1-2):73-81.
- FENDT M, SCHMID S, THAKKER DR, JACOBSON LH, YAMAMOTO R, MITSUKAWA K, MAIER R, NATT F, HÜSKEN D, KELLY PH, MCALLISTER KH, HOYER D, VAN DER PUTTEN H, CRYAN JF, FLOR PJ. 2008. mGluR7 facilitates extinction of aversive memories and controls amygdala plasticity. *Mol Psychiatry* 13:970–979.
- FITZGERALD PJ, SEEMANN JR, MAREN S. 2014. Can fear extinction be enhanced? A review of pharmacological and behavioral findings. *Brain Res Bull* 105:46-60
- FLEXNER JB, FLEXNER LB, STELLAR E. 1963. Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science*. 1963 Jul 5;141:57-9.
- FRANKLAND P, BONTEMPI B, TALTON L, KACZMAREK L, SILVA A. 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304, 881–883
- FRANKLAND PW, BONTEMPI B, TALTON LE, KACZMAREK L, SILVA AJ. 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*. 304: 881-3.
- FRANKLAND PW, BONTEMPI B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci*. Feb;6(2):119-30.
- FRANKLAND PW, DING HK, TAKAHASHI E, SUZUKI A, KIDA S, SILVA AJ. 2006. Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem* 13: 451–457.
- FRANKLAND PW, O'BRIEN C, OHNO M, KIRKWOOD A, SILVA AJ. 2001. Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature*. 17;411(6835):309-13.
- FRENKEL L., MALDONADO H., DELORENZI A. 2005. Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *Eur. J. Neurosci*. 22, 1757–1766

- FUKUSHIMA H, ZHANG Y, ARCHBOLD G, ISHIKAWA R, NADER K, KIDA S. 2014. Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. *Elife*. Jun 24;3:e02736.
- GAMACHE K, PITMAN RK, NADER K. 2012. Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*, 37(13), 2789–2796
- GAZARINI L, STERN CA, CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. 2013. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α 1- and β -adrenergic receptors. *Learn Mem*. 20: 210-9.
- GAZARINI L, STERN CA, PIORNEDO RR, TAKAHASHI RN, BERTOGLIO LJ. 2014. PTSD-like memory generated through enhanced noradrenergic activity is mitigated by a dual step pharmacological intervention targeting its reconsolidation. *Int J Neuropsychopharmacol*. 31;18(1).
- GAZARINI, L. 2015. Revisitando os mecanismos de modulação noradrenérgica sobre as memórias de medo: do fisiológico ao disfuncional. 205 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- GERACIOTI TD Jr, BAKER DG, EKHATOR NN, WEST SA, HILL KK, BRUCE AB, SCHMIDT D, ROUNDS-KUGLER B, YEHUDA R, KECK PE JR, KASCKOW JW. 2001. CSF norepinephrine concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry* 158(8):1227-1230.
- GERACIOTI TD Jr, BAKER DG, KASCKOW JW, STRAWN JR, JEFFREY MULCHAHEY J, DASHEVSKY BA, HORN PS, EKHATOR NN. 2008. Effects of trauma-related audiovisual stimulation on cerebrospinal fluid norepinephrine and corticotropin-releasing hormone concentrations in post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 33(4):416-424.
- GHOSH S, CHATTARJI S. 2015. Neuronal encoding of the switch from specific to generalized fear. *Nat Neurosci*. 18:112-20.
- GILMARTIN MR, HELMSTETTER FJ. 2010. Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. *Learn Mem* 17: 289-296.
- GILMARTIN MR, KWAPIS JL, HELMSTETTER FJ. 2013. NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in the prelimbic medial

- prefrontal cortex differentially mediate trace, delay, and contextual fear conditioning. *Learn Mem.* 15;20(6):290-4.
- GIUSTINO TF, FITZGERALD PJ, MAREN S. 2016. Revisiting propranolol and PTSD: Memory erasure or extinction enhancement? *Neurobiol Learn Mem.* 22;130:26-33.
- GUIMARÃES FS, CHIARETTI TM, GRAEFF FG, ZUARDI AW.1990. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*.100: 558-9.
- GUITTON MJ, DUDAI Y. 2004. Anxiety-like state associates with taste to produce conditioned taste aversion. *Biol Psychiatry* 56:901-904
- GUTHRIE RM, BRYANT RA. 2006. Extinction learning before trauma and subsequent posttraumatic stress. *Psychosomatic Medicine*, 68(2), 307–311.
- GUZMAN-KARLSSON MC, MEADOWS JP, GAVIN CF, HABLITZ JJ, SWEATT JD. 2014. Transcriptional and epigenetic regulation of Hebbian and non-Hebbian plasticity. *Neuropharmacology* 80:3–17.
- HAMANN, S. 2001. Cognitive and neural mechanisms of emotional memory. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 5, n. 9, p.394-400.
- HEBB DO. 1949. *The Organisation of Behaviour*. New York: Wiley.
- HERKENHAM M, LYNN AB, LITTLE MD, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA R, RICE KC. 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1932-1936.
- HERRY C, MONS N. 2004. Resistance to extinction is associated with impaired immediate early gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci.*; 20:781–790.
- HIRSCH SJ, REGMI NL, BIRNBAUM SG, GREENE RW. 2015. CA1-specific deletion of NMDA receptors induces abnormal renewal of a learned fear response. *Hippocampus.* 25(11):1374-9.
- HOFMANN SG, FANG A, GUTNER CA. 2014. Cognitive enhancers for the treatment of anxiety disorders. *Restor Neurol Neurosci* 32(1):183-195.
- HOLLAND P, BOUTON M. 1999. Hippocampus and context in classical conditioning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 195–202.
- HOLLOWAY CM, MCINTYRE CK. 2011. Post-training disruption of Arc protein expression in the anterior cingulate cortex impairs long-term memory for inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(4), 425–432.

- HOLMES A, QUIRK GJ. 2010. Pharmacological facilitation of fear extinction and the search for adjunct treatments for anxiety disorders: the case of yohimbine. *Trends Pharmacol Sci* 31:2–7.
- HONG I, KIM J, KIM J, LEE S, KO HG, NADER K, KAANG BK, TSIEN RW, CHOI S. 2013. AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14;110(20):8218-23.
- HOOVER WB, VERTES RP. 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct*. 212:149-79.
- HUANG, C. C.; LIN, H. J.; HSU, K. S. 2007. Repeated cocaine administration promotes long-term potentiation induction in rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, v. 17, n. 8, p. 1877-1888.
- HYMAN JM, MA L, BALAGUER-BALLESTER E, DURSTEWITZ D, SEAMANS JK. 2012. Contextual encoding by ensembles of medial prefrontal cortex neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 5086–5091
- ITZHAK Y, PEREZ-LANZA D, LIDDIE S. 2014. The strength of aversive and appetitive associations and maladaptive behaviors. *IUBMB Life*. 66(8):559-71.
- JAROME TJ, WERNER CT, KWAPIS JL, HELMSTETTER FJ. 2011. Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala. *PLoS One*. 6(9):e24349.
- JOËLS M, FERNANDEZ G, ROOZENDAAL B. 2011. Stress and emotional memory: a matter of timing. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 15, n. 6, p. 280-288.
- JOHANSEN JP, CAIN CK, OSTROFF LE, LEDOUX JE. 2011. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 147(3):509-524.
- JOVANOVIĆ T, KAZAMA A, BACHEVALIER J, DAVIS M. 2012. Impaired safety signal learning may be a biomarker of PTSD. *Neuropharmacology*, 62(2), 695–704.
- JOVANOVIĆ T, NORRHOLM SD, BLANDING NQ, DAVIS M, DUNCAN E, BRADLEY B, RESSLER KJ. 2010. Impaired fear inhibition is a biomarker of PTSD but not depression. *Depression and Anxiety*, 27(3), 244–251.
- JOVANOVIĆ T, NORRHOLM SD, FENNELL JE, KEYES M, FIALLOS AM, MYERS KM, DAVIS M, DUNCAN EJ. 2009.

- Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: Relation to symptom severity. *Psychiatry Research*, 167(1–2), 151–160.
- JOVANOVIĆ T, NORRHOLM SD. 2011. Neural mechanisms of impaired fear inhibition in posttraumatic stress disorder. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5,44.
- JOVANOVIĆ T, RESSLER KJ. 2010. How the neurocircuitry and genetics of fear inhibition may inform our understanding of PTSD. *The American Journal of Psychiatry*, 167(6), 648–662.
- KANDEL ER. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 2;294(5544):1030-8.
- KAOUANE N, PORTE Y, VALLÉE M, BRAYDA-BRUNO L, MONS N, CALANDREAU L, MARIGHETTO A, PIAZZA PV, DESMEDT A. 2012. Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. *Science*. 23;335:1510-3.
- KELLY MT, CRARY JF, SACKTOR TC. 2007. Regulation of protein kinase M ζ synthesis by multiple kinases in long-term potentiation. *J. Neurosci*. 27, 3439–3444.
- KIM EJ, KIM N, KIM HT, CHOI JS. 2013. The prelimbic cortex is critical for context-dependent fear expression. *Front Behav Neurosci*. 21;7:73.
- KIM JJ, JUNG MW. 2006. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30(2):188
- KIM R, MOKI R, KIDA S. 2011. Molecular mechanisms for the destabilization and restabilization of reactivated spatial memory in the Morris water maze. *Mol Brain*. 11;4:9.
- KINCHESKI GC, CAROBREZ AP. 2010. The dorsal periaqueductal gray modulates the increased fear-like behavior exhibited by experienced rats in the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*. 5;206:120-6.
- KINCHESKI GC, MOTA-ORTIZ SR, PAVESI E, CANTERAS NS, CAROBREZ AP. 2012. The dorsolateral periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. *PLoS One*. 7(11):e50361.
- KINDT M, SOETER M, VERVLIET B. 2009. Beyond extinction: Erasing human fear responses and preventing the return of fear. *Nature Neuroscience*, 12(3), 256–258

- KLUMPERS F, DENYS D, KENEMANS JL, GRILLON C, VAN DER AART J, BAAS JM. 2012. Testing the effects of Δ^9 -THC and D-cycloserine on extinction of conditioned fear in humans. *J Psychopharmacol* 26(4):471-478
- KNAPSKA E, MAREN S. 2009. Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. *Learn Mem.* 24;16:486-93.
- KNIERIM JJ, LEE I, HARGREAVES EL. 2006. Hippocampal place cells: parallel input streams, subregional processing, and implications for episodic memory. *Hippocampus*, v. 16, n. 9, p. 755-764.
- KORB E, FINKBEINER S. 2011. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci* 34 (11): 591-598.
- KORZUS E. 2015. Prefrontal Cortex in Learning to Overcome Generalized Fear. *J Exp Neurosci.* 15;9:53-6.
- LABAR KS, CABEZA R. 2006. Cognitive neuroscience of emotional memory. *Nature Reviews Neuroscience*, v.7, n. 1, p. 54-64
- LANIUS RA, FREWEN PA, VERMETTEN E, YEHUDA R. 2010. Fear conditioning and early life vulnerabilities: two distinct pathways of emotional dysregulation and brain dysfunction in PTSD. *European Journal of Psychotraumatology.* 1:5467.
- LAROCHE S, JAY TM, THIERRY AM. 1990. Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region. *Neuroscience letters*, v. 114, n. 2, p. 184-190.
- LASHLEY KS. 1917. The effect of strychnine and caffeine upon rate of learning. *Psychobiology.* 1:141–170.
- LEDOUX JE. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
- LEE JL, EVERITT BJ, THOMAS KL. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304, 839–843.
- LEE JL. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat. Neurosci.* 11, 1264–1266
- LEE JL. 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav. Neurosci.* 4, 168.
- LEE SH, CHOI JH, LEE N, LEE HR, KIM JI, YU NK, CHOI SL, LEE SH, KIM H, KAANG BK. 2008. Synaptic protein degradation

- underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*. 29;319(5867):1253-6.
- LEMOS JI, RESSTEL LB, GUIMARÃES FS. 2010. Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res*. 207:105-11.
- LIM EP, TAN CH, JAY TM, DAWE GS. 2010. Locus coeruleus stimulation and noradrenergic modulation of hippocampoprefrontal cortex long-term potentiation. *Int J Neuropsychopharmacol*.13:1219-31.
- LOFTIS JM, JANOWSKY A. 2003. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther*. 97(1):55-85.
- LONERGAN ME, GAFFORD GM, JAROME TJ, HELMSTETTER FJ. 2010. Time-dependent expression of Arc and zif268 after acquisition of fear conditioning. *Neural Plast*. 139891.
- LOPEZ-SALON M, ALONSO M, VIANNA MR, VIOLA H, MELLO E SOUZA T, IZQUIERDO I, PASQUINI JM, MEDINA JH. 2001. The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *Eur J Neurosci*. 14(11):1820-6.
- LÜSCHER C, MALENKA RC. 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1;4(6).
- MACTUTUS CF, RICCIO DC, FERREK JM. 1979. Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science*. 204:1319-20.
- MAREN S, HOBIN JA. 2007. Hippocampal regulation of context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala. *Learn. Mem*.14, 318–324.
- MAREN S, PHAN KL, LIBERZON I. 2013. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci* 14:417-428.
- MAREN S; QUIRK GJ.2004. Neuronal signalling of fear memory. *Nature*. 5: 844-852
- MCGAUGH JL, PETRINOVICH LF. 1965. Effects of drugs on learning and memory. *Int Rev Neurobiol*. 8:139-96.
- MCGAUGH JL. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science*. 16; 153(3742):1351-8.
- MCGAUGH JL. 1973. Drug facilitation of learning and memory. *Annu Rev Pharmacol*. 13:229-41.

- MCGAUGH JL. 2013. Making lasting memories: Remembering the significant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, p. 10402-10407.
- MCREYNOLDS JR, HOLLOWAY-ERICKSON CM, PARMAR TU, MCINTYRE CK. 2014. Corticosterone-induced enhancement of memory and synaptic Arc protein in the medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem.* Jul;112:148-57.
- MERLO E, MILTON AL, GOOZÉE ZY, THEOBALD DE, EVERITT BJ. 2014. Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: behavioral and molecular evidence. *J Neurosci* 34(7):2422-2431.
- MIKKELSEN JD, LARSEN MH. 2006. Effects of stress and adrenalectomy on activity-regulated cytoskeleton protein (Arc) gene expression. *Neuroscience Letters*, 403(3), 239–243.
- MILAD MR, PITMAN RK, ELLIS CB, GOLD AL, SHIN LM, LASKO NB, ZEIDAN MA, HANDWERGER K, ORR SP, RAUCH SL. 2009. Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, 66(12), 1075–1082
- MILAD MR, QUIRK GJ. 2002. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*, 420(6911), 70–74
- MILAD MR, RAUCH SL, PITMAN RK, QUIRK GJ. 2006. Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. *Biol Psychol* 73: 61–71.
- MILAD MR, ROSENBAUM BL, SIMON NM. 2014. Neuroscience of fear extinction: Implications for assessment and treatment of fear-based and anxiety related disorders. *Behav Res Ther* 62:17-23.
- MILEKIC MH, ALBERINI CM. 2002. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron* 36: 521–525.
- MILNER B, SQUIRE LR, KANDEL E. 1998. Cognitive Neuroscience and the Study of Memory. *Neuron*, v. 20, p. 445-468.
- MILTON AL, MERLO E, RATANO P, GREGORY BL, DUMBRECK JK, EVERITT BJ. 2013. Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory. *J Neurosci.* 16;33(3):1109-15.

- MISANIN JR, MILLER RR, LEWIS DJ. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*. 160: 554-5.
- MOCHNY CR, KINCHESKI GC, MOLINA VA, CAROBREZ AP. 2013. Dorsolateral periaqueductal gray stimulation prior to retrieval potentiates a contextual fear memory in rats. *Behav Brain Res*. 15;237:76-81.
- MONFILS MH, COWANSAGE KK, KLANN E, LEDOUX JE. 2009. Extinction-reconsolidation boundaries: Key to persistent attenuation of fear memories. *Science*, 324(5929), 951–955
- MORAES CL, BERTOGLIO LJ, CAROBREZ AP. 2008. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*. 12;194:181-6.
- MORRIS RW, BOUTON ME. 2007. The effect of yohimbine on the extinction of conditioned fear: a role for context. *Behav Neurosci* 121:501–514.
- MUIGG P, HETZENAUER A, HAUER G, HAUSCHILD M, GABURRO S, FRANK E, LANDGRAF R, SINGEWALD N. 2008. Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety - evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. *Eur J Neurosci*.;28:2299–2309.
- MÜLLER GE, PILZECKER A. 1900. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. *Zeitschrift fuer Psychologie* 1:1–288.
- MYERS KM, DAVIS M. 2007. Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry* 12:120–150.
- NADER K, EINARSSON EO. 2010. Memory reconsolidation: an update. *Ann N Y Acad Sci*. 1191:27-41.
- NADER K, HARDT O. 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci*. 10: 224-34.
- NADER K, SCHAFE GE, LE DOUX JE. 2000a. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722–726.
- NADER K, SCHAFE GE, LEDOUX JE. 2000b. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci*. 1:216-9.
- NEISSER U, WINOGRAD E, BERGMAN ET, SCHREIBER CA, PALMER SE, WELDON MS. 1996. Remembering the earthquake: direct experience vs. hearing the news. *Memory* 4, 337–357.

- NESTLER EJ, BARROT M, SELF DW. 2001. DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25;98(20):11042-6.
- NESTLER EJ, KELZ MB, CHEN J. 1999. Δ FosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res* 835:10–17.
- NESTLER EJ. 2015. FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *Eur J Pharmacol* 753:66–72.
- NIKULINA EM, ARRILLAGA-ROMANY I, MICZEK KA, HAMMER RP Jr. 2008. Long-lasting alteration in mesocorticolimbic structures after repeated social defeat stress in rats: time course of μ -opioid receptor mRNA and FosB/ Δ FosB immunoreactivity. *Eur J Neurosci* 27:2272–2284.
- O'DONNELL T, HEGADOREN KM, COUPLAND NC. 2004. Noradrenergic mechanisms in the pathophysiology of post-traumatic stress disorder. *Neuropsychobiology* 50, 273–283
- OGDEN KK, TRAYNELIS SF, 2011. New advances in NMDA receptor pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 726–733
- ORSINI CA, MAREN S. 2012. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci Biobehav Rev* 36(7):1773-1802.
- ORTIZ V, GIACHERO M, ESPEJO PJ, MOLINA VA, MARTIJENA ID. 2015. The effect of Midazolam and Propranolol on fear memory reconsolidation in ethanol-withdrawn rats: influence of d-cycloserine. *Int J Neuropsychopharmacol.* 23;18(4).
- OUYANG M, THOMAS SA. 2005. A requirement for memory retrieval during and after long-term extinction learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9347–9352.
- PAPE HC, PARE D. 2010. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev.* 90(2):419-63.
- PARK CR, CAMPBELL AM, DIAMOND DM. 2001. Chronic psychosocial stress impairs learning and memory and increases sensitivity to yohimbine in adult rats. *Biological Psychiatry.* 50: 994-1004.
- PARSONS RG, RESSLER KJ. 2013. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nature Neuroscience.* 16(2):146-53.
- PASTALKOVA E, SERRANO P, PINKHASOVA D, WALLACE E, FENTON AA, SACKTOR TC. 2006. Storage of spatial

- information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313: 1141-1144
- PAVESI E, CANTERAS NS, CAROBREZ AP. 2011. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using β -adrenoceptor activation of the dorsal premammillary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. *Neuropsychopharmacology* 36(5):926-939
- PAVLOV IP. 1927. Conditioned Reflexes. London: *Oxford University Press*.
- PETERS J, KALIVAS PW, QUIRK GJ. 2009. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learn Mem.* 16:279-88.
- PHELPS EA, LEDOUX JE. 2005. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*. 20;48(2):175-87.
- PITMAN RK, DELAHANTY DL. 2005. Conceptually driven pharmacologic approaches to acute trauma. *CNS Spectr.* 2, 99–106
- PITMAN RK, RASMUSSEN AM, KOENEN KC, SHIN LM, ORR SP, GILBERTSON MW, MILAD MR, LIBERZON I. 2012. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nature Review Neuroscience*. 13(11):769-87.
- PITMAN RK. 1989. Post-traumatic stress disorder, hormones, and memory. *Biol Psychiatry* 26:221-223.
- PITMAN RK. 2011. Will reconsolidation blockade offer a novel treatment for posttraumatic stress disorder? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5,11
- PITTENGER C. 2013. Disorders of memory and plasticity in psychiatric disease. *Dialogues Clin Neurosci.* 15(4): 455–463.
- PONNUSAMY R, NISSIM HA, BARAD M. 2005. Systemic blockade of D2-like dopamine receptors facilitates extinction of conditioned fear in mice. *Learn Mem* 12:399–406.
- PORTES, MAM. 2016. Adrenalina e noradrenalina promovem a generalização da resposta de medo por ativarem receptores alfa-1 e beta adrenérgicos do córtex pré-límbico durante a consolidação de uma memória aversiva. 100 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- PRZYBYSLAWSKI J, SARA SJ. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Beh Brain Res.* 84:241-6.

- QUINN J, MA Q, TINSLEY M, KOCH C, FANSELOW M. 2008. Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. *Learn. Mem.* 15, 368–372
- QUIRK GJ, GARCIA R, GONZALEZ-LIMA F. 2006. Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biol Psychiatry* 60: 337–343.
- QUIRK GJ, MUELLER D. 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33:56-72.
- RAU V, DECOLA JP, FANSELOW MS. 2005. Stress-induced enhancement of fear learning: an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neuroscience Biobehavioral Review*. 29(8):1207-23.
- RAUCH SL, SHIN LM, PHELPS EA. 2006. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research, past, present, and future. *Biol Psychiatry* 60: 376–382.
- REIS DS, JAROME TJ, HELMSTETTER FJ. 2013. Memory formation for trace fear conditioning requires ubiquitin-proteasome mediated protein degradation in the prefrontal cortex. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 150.
- ROGAN MT, STÄUBLI U, LEDOUX JE. 1997. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, v. 390, p. 604-607.
- ROOZENDAAL B, MCEWEN BS, CHATTARJI S. 2009. Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci.* 10(6):423-33.
- ROTHBAUM BO, DAVIS M. 2003. Applying learning principles to the treatment of post-trauma reactions. *Ann NY Acad Sci* 1008: 112–121.
- ROTHBAUM BO, PRICE M, JOVANOVIĆ T, NORRHOLM SD, GERARDI M, DUNLOP B, DAVIS M, BRADLEY B, DUNCAN EJ, RIZZO A, RESSLER KJ. 2014. A randomized, double-blind evaluation of D-cycloserine or alprazolam combined with virtual reality exposure therapy for posttraumatic stress disorder in Iraq and Afghanistan War veterans. *Am J Psychiatry* 171(6):640-648.
- ROUGEMONT-BÜCKING A, LINNMAN C, ZEFFIRO TA, ZEIDAN MA, LEBRON-MILAD K, RODRIGUEZ-ROMAGUERA J, RAUCH SL, PITMAN RK, MILAD MR. 2011. Altered

- processing of contextual information during fear extinction in PTSD: an fMRI study. *CNS Neurosci Ther.* 17:227-36.
- ROY M, SHOHAMY D, WAGER TD. 2012. Ventromedial prefrontal-subcortical systems and the generation of affective meaning. *Trends Cogn Sci* 16, 147–156.
- ROZESKE RR, VALERIO S, CHAUDUN F, HERRY C. 2014. Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. *Genes Brain Behav.* 14:22-36.
- RYB GE, DISCHINGER PC, READ KM, KUFERA JA. 2009. PTSD after severe vehicular crashes. *Ann Adv Automot Med.* 53:177-93.
- SACCHETTI B, LORENZINI CA, BALDI E, BUCHERELLI C, ROBERTO M, TASSONI G, BRUNELLI M. 2002. Time-dependent inhibition of hippocampal LTP in vitro following contextual fear conditioning in the rat. *Eur J Neurosci.* 15 (1): 143-50.
- SACKTOR TC. 2008. PKMzeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Prog Brain Res* 169: 27-40
- SACKTOR TC. 2011. How does PKM ζ maintain long-term memory? *Nature Reviews Neuroscience* 12, 9-15
- SAKATA K, MARTINOWICH K, WOO NH, SCHLOESSER RJ, JIMENEZ DV, JI Y, SHEN L, LU B. 2013. Role of activity-dependent BDNF expression in hippocampal-prefrontal cortical regulation of behavioral perseverance. *Proc Natl Acad Sci U S A*.110:15103-8.
- SANHUEZA M, FERNANDEZ-VILLALOBOS G, STEIN IS, KASUMOVA G, ZHANG P, BAYER KU, OTMAKHOV N, HELL JW, LISMAN J. 2011. Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the maintenance of synaptic strength. *J Neurosci.* 22;31(25):9170-8.
- SARA SJ. 2000a. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem.* 7, 73–84
- SARA SJ. 2000b. Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 212–213
- SARA SJ. 2010. Reactivation, retrieval, replay and reconsolidation in and out of sleep: connecting the dots. *Front Behav Neurosci* 4, 185.
- SCHWABE L, NADER K, PRUESSNER JC. 2014. Reconsolidation of human memory: brain mechanisms and clinical relevance. *Biol Psychiatry.* 15;76(4):274-80.

- SENN V, WOLFF SB, HERRY C, GRENIER F, EHRLICH I, GRÜNDEMANN J, FADOK JP, MÜLLER C, LETZKUS JJ, LÜTHI A. 2014. Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. *Neuron*. 22;81:428-37.
- SHAH AA, SJOVOLD T, TREIT D. 2004. Inactivation of the medial prefrontal cortex with the GABAA receptor agonist muscimol increases open-arm activity in the elevated plus-maze and attenuates shock-probe burying in rats. *Brain Res*. 1028: 112-115.
- SHIN, L. M.; RAUCH, S. L.; PITMAN, R. K. 2006. Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1071, p. 67-79.
- SIAPAS AG, LUBENOV EV, WILSON MA. 2005. Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron* 46, 141–151.
- SIERRA-MERCADO D, PADILLA-COREANO N, QUIRK GJ. 2011. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacol* 36, 529–538.
- SMITS JA, ROSENFELD D, OTTO MW, MARQUES L, DAVIS ML, MEURET AE, SIMON NM, POLLACK MH, HOFMANN SG. 2013. D-cycloserine enhancement of exposure therapy for social anxiety disorder depends on the success of exposure sessions. *J Psychiatr Res* 47(10):1455-1461.
- SOTRES-BAYON F, BUSH DE, LEDOUX JE. 2004. Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction. *Learn Mem* 11: 525–535.
- SOTRES-BAYON F, BUSH DE, LEDOUX JE. 2007. Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology* 32:1929–1940.
- SOTRES-BAYON F, SIERRA-MERCADO D, PADILLA-DELGADO E, QUIRK GJ. 2012. Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. *Neuron*. 21;76:804-12.
- SQUIRE LR, KANDEL ER, EICHENBAUM H. 2012. Memory: From Mind to Molecules, L.R. *The Cognitive Neuroscience of Memory*.
- STERN CA, DO MONTE FH, GAZARINI L, CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. 2010. Activity in prelimbic cortex is required

- for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. *Neuroscience*. 29;170(1):214-22.
- STERN CA, GAZARINI L, TAKAHASHI RN, GUIMARÃES FS, BERTOGLIO LJ. 2012. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. *Neuropsychopharmacology*, 37: 2132-2142.
- STERN CA, GAZARINI L, VANVOSSSEN AC, HAMES MS, BERTOGLIO LJ. 2014. Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time. *Learn Mem*. 16;21:14-20.
- STERN CA, GAZARINI L, VANVOSSSEN AC, ZUARDI AW, GALVE-ROPERH I, GUIMARAES FS, TAKAHASHI RN, BERTOGLIO LJ. 2015. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol alone and combined with cannabidiol mitigate fear memory through reconsolidation disruption. *Eur Neuropsychopharmacol*. 25(6):958-65.
- STERN, CAJ. 2014. Efeito do canabidiol sobre a reconsolidação da memória de medo ao contexto: envolvimento dos receptores CB1 do córtex pré-límbico. 136 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- STEWART O, SCHUMAN EM. 2001. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci*. 24:299-325.
- SUZUKI A, JOSSELYN SA, FRANKLAND PW, MASUSHIGE S, SILVA AJ, KIDA S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24: 4787–4795.
- SUZUKI A, MUKAWA T, TSUKAGOSHI A, FRANKLAND PW, KIDA S. 2008. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn Mem*. 29;15(6):426-33.
- TANAKA KZ, PEVZNER A, HAMIDI AB, NAKAZAWA Y, GRAHAM J, WILTGEN BJ. 2014. Cortical representations are reinstated by the hippocampus during memory retrieval. *Neuron*. 22;84(2):347-54.
- TANG J, KO S, DING HK, QIU CS, CALEJESAN AA, ZHUO M. 2005. Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. *Mol Pain*. 9;1:6.
- TAUBENFELD SM, MILEKIC MH, MONTI B, ALBERINI CM. 2001. The consolidation of new but not reactivated memory

- requires hippocampal C/EBP β . *Nat. Neurosci.* 4, 813–818.10.1038/90520
- TRONEL S, MILEKIC MH, ALBERINI CM. 2005. Linking new information to a reactivated memory requires consolidation and not reconsolidation mechanisms. *PLoS Biol.* 3, 1630–1638.
- TRONEL S, SARA SJ. 2003. Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. *J. Neurosci.* 23: 5472–5476
- TRONSON NC, TAYLOR JR. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8: 262–275.
- TRONSON NC, WISEMAN SL, OLAUSSON P, TAYLOR JR. 2006. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat. Neurosci.* 9, 167–169
- UIERY-REYNOLDS PG, CASTILLO MA, VIALOU V, RUSSO SJ, NESTLER EJ. 2009. Phosphorylation of DeltaFosB mediates its stability in vivo. *Neuroscience* 158:369–372.
- VERTES RP. 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse.* 51:32–58.
- VIALOU V, BAGOT RC, CAHILL ME, FERGUSON D, ROBISON AJ, DIETZ DM, FALLON B, MAZEI-ROBISON M, KU SM, HARRIGAN E, WINSTANLEY CA, JOSHI T, FENG J, BERTON O, NESTLER EJ. 2014. Prefrontal cortical circuit for depression- and anxiety-related behaviors mediated by cholecystokinin: role of Δ FosB. *J Neurosci.* 12;34(11):3878–87.
- VIDAL-GONZALEZ I, VIDAL-GONZALEZ B, RAUCH SL, QUIRK GJ. 2006. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem.*13:728–733.
- VON HERTZEN LS, GIESE KP. 2005. Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J. Neurosci.* 25, 1935–1942.10.1523/JNEUROSCI.4707-04.2005
- WALKER DL, DAVIS M. 2002. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacol Biochem Behav* 71:379–392.
- WANG SH, DE OLIVEIRA ALVARES L, NADER K. 2009. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nat Neurosci* 12:905–912.

- WANG W, LIU Y, ZHENG H, WANG HN, JIN X, CHEN YC, ZHENG LN, LUO XX, TAN QR. 2008. A modified single prolonged stress model for post-traumatic stress disorder. *Neuroscience Letters*. 441(2):237-41.
- WILTGEN BJ, SILVA AJ. 2007. Memory for context becomes less specific with time. *Learning and Memory*, v. 14, n. 4, p. 313-317.
- WOOD KH, VER HOEF LW, KNIGHT DC. 2012. Neural mechanisms underlying the conditioned diminution of the unconditioned fear response. *Neuroimage* 60, 787–799.
- WRUBEL KM, BARRETT D, SHUMAKE J, JOHNSON SE, GONZALEZ-LIMA F 2007. Methylene blue facilitates the extinction of fear in an animal model of susceptibility to learned helplessness. *Neurobiol Learn Mem* 87:209–217.
- XUE YX, ZHU ZZ, HAN HB, LIU JF, MENG SQ, CHEN C, YANG JL, WU P, LU L. 2015. Overexpression of Protein Kinase M ζ in the Prelimbic Cortex Enhances the Formation of Long-Term Fear Memory. *Neuropsychopharmacology*. 25.
- YAMAMOTO S, MORINOBU S, FUCHIKAMI M, KURATA A, KOZURU T, YAMAWAKI S. 2008. Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. *Neuropsychopharmacology*. 33(9):2108-16.
- YEHUDA R, LEDOUX J. 2007. Response variation following trauma: a translational neuroscience approach to understanding PTSD. *Neuron*. 56(1):19-32.
- YEHUDA R. 2006. Advances in understanding neuroendocrine alterations in PTSD and their therapeutic implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1071, 137–166
- YOUNG S, BOHENEK D, FANSELOW M. 1994. NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. *Behav. Neurosci.* 108, 19–29.
- ZELIKOWSKY M, BISSIERE S, HAST TA, BENNETT RZ, ABDIPRANOTO A, VISSSEL B, FANSELOW MS. 2013. Prefrontal microcircuit underlies contextual learning after hippocampal loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11;110(24):9938-43.
- ZELIKOWSKY M, HERSMAN S, CHAWLA MK, BARNES CA, FANSELOW MS. 2014. Neuronal ensembles in amygdala,

- hippocampus, and prefrontal cortex track differential components of contextual fear. *J Neurosci.* 18;34:8462-6.
- ZHANG Y, FUKUSHIMA H, KIDA S. 2011. Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol Brain.* 19: 4 - 4.
- ZHOU HC, SUN YY, CAI W, HE XT, YI F, LI BM, ZHANG XH. 2013. Activation of beta2-adrenoceptor enhances synaptic potentiation and behavioral memory via cAMP-PKA signaling in the medial prefrontal cortex of rats. *Learn. Mem.* 20, 274–284.
- ZOLADZ PR, CONRAD CD, FLESHNER M, DIAMOND DM. 2008. Acute episodes of predator exposure in conjunction with chronic social instability as an animal model of post-traumatic stress disorder. *Stress.* 11(4):259-81.
- ZOLADZ PR, DIAMOND DM. 2013. Current status on behavioral and biological markers of PTSD: a search for clarity in a conflicting literature. *Neurosci Biobehav Rev.* 37(5):860-95.
- ZOLADZ PR, FLESHNER M, DIAMOND DM. 2012. Psychosocial animal model of PTSD produces a long-lasting traumatic memory, an increase in general anxiety and PTSD-like glucocorticoid abnormalities. *Psychoneuroendocrinology.* 37(9):1531-45.